

DIE IN VITRO - WIRKUNG VON OXYPHENBUTAZON
AUF DEN KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL
UNTERSCHIEDLICH ALTER RINDERLINSEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Ulrich Kuhlmann
aus Lemgo

Bonn 1969

DIE IN VITRO - WIRKUNG VON OXYPHENBUTAZON
AUF DEN KOHLENHYDRATSTOFFWECHSEL
UNTERSCHIEDLICH ALTER RINDERLINSEN

Inaugural-Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Hohen Medizinischen Fakultät
der
Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität
zu Bonn

vorgelegt von
Ulrich Kuhlmann
aus Lemgo

Bonn 1969

Angefertigt mit Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Bonn

Referent: Professor Dr. O. Hockwin

Korreferent: Professor Dr. E. Weigelin

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 6.1969

Aus der biochemischen Abteilung (Abt.Vorsteher:
Prof. Dr. Hockwin) des Instituts für experimen-
telle Ophthalmologie der Universität Bonn.
Direktor: Professor Dr. E. Weigelin

In Dankbarkeit

MEINEM VATER

gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA40153520_0194

Herrn Professor Dr. O. Hockwin danke ich für die
Überlassung der Arbeit, für sein freundliches Ent-
gegenkommen und seinen ständigen Rat.

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
I.) LITERATURVERZEICHNIS	8
II.) PROBLEMSTELLUNG	13
III.) LITERATUR	16
a) Allgemeine Pharmakologie der Pyrazole und Pyrazolidine	16
b) Oxyphenylbutazon als Stoffwechselpro- dukt des Butazolidins	18
c) Oxyphenylbutazon (Tanderil) in der Augenheilkunde	21
d) Physiologie und Pathologie des Linsen- stoffwechsels	22
e) Die Biochemie der Entzündung	25
IV.) EXPERIMENTELLER TEIL	29
a) Nährlösungen	29
b) Gewinnung des Linsenmaterials, Linsen- präparation und Aufarbeitung der Lin- sen für die einzelnen Bestimmungsmethoden	30
c) Allgemeines zur Ausführung enzymatischer Testmethoden	33
d) Bestimmung der einzelnen Fermente und Substrate und deren Berechnung	36
V.) VERSUCHSERGEBNISSE	56
VI.) DISKUSSION	66
VII.) ZUSAMMENFASSUNG	70
VIII.) LEBENSLAUF	94

I. LITERATURVERZEICHNIS

1. Bergmeier, H.U.:
Methoden der enzymatischen Analyse.
Verlag Chemie, Weinheim/Bergstr. (1962)
2. Bergaust, B.:
Oxyphenylbutazone (Tanderil) Therapy in acute
Iridocyclitis.
Acta ophthalmologica Vol. 40, 379-384 (1962)
3. Bürger, M.:
Biomorphose der Säugetierlinsen.
Klin.Mbl.Augenheilk. 142, 22-39 (1963)
4. Burns, J.J., R.K. Rose, S. Godwin, J. Reichenthal, E.C.
Horning u. B.B. Brodie:
The metabolic fate of Phenylbutazone (Butazolidin) in
man.
J. Pharmacol. and Exper. Therap. 113, 481-489 (1955)
5. Carlsson, D.:
Kurzes Lehrbuch der Biochemie.
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1964).
6. Dardenne, U. u. G. Drechsler:
Die Aktivität der Milchsäuredehydrogenase in tierischen
und menschlichen Augenlinsen.
Graefes Arch. Ophthal. 164, 156-162 (1961)
7. Dardenne, U., O. Kleifeld u. G. Schäfer:
Die Altersabhängigkeit der Aldolaseaktivität in einzel-
nen Abschnitten der Rinderlinse.
Graefes Arch. Ophthal. 158, 172-181 (1956)
8. Domenjoz, R.:
Pharmakologische Aspekte von Butazolidin, ein neues
Antirheumatikum.
Int. Record Med. 165, 367-442 (1952)
9. Dudik, E.:
Klinische Beobachtungen mit Butazolidin.
Schweizerische Rundschau für Med. 42. Jahrgang, 11,
205-206 (1953)

10. Gil del Rio, E.:
El Tanderil en Oftalmologia .
A. Soc. O.H.A. 22/8, 667-682 (1962)
11. Herrmann, B.:
Über den Stoffwechsel des Butazolidins .
Medicina Experimentalis I, 170-178 (1959)
12. Hiller, J. u. E. Strauss:
Zur Frage der Stoffwechselwirksamkeit von Pyrazolon-
derivaten .
Die Medizinische 17, 613-615 (1954)
13. Hockwin, O. u. P. Berghoff:
Untersuchungen verschiedener Fermentaktivitäten mensch-
licher Linsen in Abhängigkeit von der Lokalisation der
Linsentrübung.
Klin. Mbl. Augenheilk. 149, 87-97 (1966)
14. Hockwin, O., W. Licht u. E. Noll:
Veränderungen verschiedener Fermentaktivitäten in Lin-
sen von Meerschweinchen mit zunehmendem Lebensalter.
Graefes Arch. Ophthal. 167, 158-168 (1964)
15. Höpping, W.:
Über die Wirksamkeit von Tanderil bei entzündlichen
Reiz- und Schwellungszuständen des Auges.
Klin. Mbl. Augenheilk. 142, 1061-1063 (1963)
16. Kleinfeld, O. u. O. Hockwin:
Über den Kohlenhydratstoffwechsel der Linse in Ab-
hängigkeit vom Lebensalter und bei experimentell er-
zeugten Stoffwechselstörungen.
Ber. Dtsch. Ophthal. Ges. 158, 34-38 (1960)
17. Kleinfeld, O. u. O. Hockwin:
Die Wirkung von Dinitrophenol, Äthylendiamintetraessig-
säure, Diamox und Butazolidin auf Stoffwechselabläufe
der Linse.
Graefes Arch. Ophthal. 158, 54-63 (1956)
18. Köhler, V.:
Beeinflussung der P32-Aufnahme der überlebenden Horn-
haut durch Butazolidin.

Ärztliche Forschung, IX. Jahrgang, Heft 7, 346-348
(1955)

19. Kurus, E. u. B. Bach:
Über die Wirksamkeit des Butazolidins bei entzündlichen
Veränderungen des vorderen Augenabschnittes.
Klin. Mbl. Augenheilk. 137, 198-211 (1960)
20. Liesenhoff, H.:
Untersuchungen über einige Stoffwechselvorgänge in der
Linse. Diss. Bonn 1958
21. Meyer - Schwickerath, G., E. Grüterich u. P. Niesel:
Die Wirkung von Butazolidin auf experimentelle Ent-
zündungen am Augenhintergrund.
Klin. Mbl. Augenheilk. 129, 358 (1956)
22. Müller, H.K.:
Über Altersveränderungen der Glykolyse in der Linse.
Arch. Augenheilk. 110, 206 (1937)
23. Müller, H.K., O. Hockwin u. U. Dardenne:
Über den Stoffwechsel der Linse.
Almanach für Augenheilk. 1964 S. 101-120, J.F. Leh-
manns-Verlag München
24. Müller, H.K.:
Über die Bildung von Vitamin C in der Linse.
Arch. Augenheilk. 109, 434-440 (1936)
25. Münich, W.:
Experimentelle Untersuchungen und klinische Erfahrun-
gen mit 1 - Phenyl - 2 (- p - Hydroxyphenyl) - 3,5 -
dioxy - 4 n - butyl - pyrazolidin bei der Behandlung
entzündlicher Erkrankungen der vorderen Augenabschnit-
te.
Arzneimittelforsch. 13/9, 812-814 (1963)
26. Münich, W.:
Experimentelle Untersuchungen über den Einfluß von 3,
5 Dioxo - 1 - Phenyl - 2 - p - Hydroxyphenyl - 4 n -
butyl - pyrazolidin auf die Aufnahme von S35 Sulfat
in die Hornhautgewebe.
Arzneimittelforsch. 11, 773-775 (1961)

27. Péne, P.:
La phénylbutazone en ophthalmologie .
Diss. Toulouse 1955
28. Pfister, R. u. F. Häflinger:
Über Derivate des Phenylbutazons. In den Benzolkernen
hydroxylierte Derivate.
Helvetia chimica Acta 40, 395-401 (1957)
29. Rechenberg, K.H.:
Butazolidin (Phenylbutazon)
Georg Thieme Verlag (1957)
30. Schumacher, H.:
Experimentelle Untersuchungen über den Mechanismus der
antiphlogistischen Wirkung von Butazolidin, Cortison
und Salizylsäure.
Zeitschrift für Rheumaforschung, Heft 1/2, 22-24 (1955)
31. Sedlmayr, G. u. H. Holzer:
Pyrazolone und energiereiches Phosphat.
Klinische Wochenschrift 34. Jahrgang, Heft 5/6 S. 133-
134 (1956)
32. Smith, V.H. u. D. Fowler:
The antiinflammatory effect of oxyphenbutazone (Tan-
deril) following cataract and squint operations.
Symposium Report: The importance and treatment of
inflammation in ophthalmology (September 29th -
October 2nd 1966) 29-37
33. Steiner, L.:
Experiences with oxyphenbutazone (Tanderil)
Symposium Report: The importance and treatment of
inflammation in ophthalmology, 25 - 28 (September
29th - October 2nd 1966)
34. Süllmann, H.:
Der Kohlenhydratstoffwechsel der Linse.
Arch. Augenheilk. 110, 303-320 (1937)
35. Voelkel, A.:
Zum Problem der Grenzflächenwirksamkeit von Pyrazol-
derivaten.

- Arch. int. Pharmacodyn. C II No. 1-2, 194-206 (1955)
36. Warburg, O.:
Weiterentwicklung zellphysiologischer Methoden.
Georg Thieme Verlag (1962)
37. Weimar, M.L.:
Untersuchungen über Fermentaktivitäten in einzelnen
Teilen unterschiedlich alter Rinderlinsen.
Diss. Bonn 1966
38. Werner, J.E.L.:
Hydroxyphenylbutazone (Tanderil) in the treatment of
ocular disease.
Brit. J. Ophthal. 44, 755 (1960)
39. Wilhelmi, G.:
Beitrag zur Frage der Stimulation des Hypophysen-
Nebennierensystems durch Pyrazole.
Arch. für experimentelle Pathologie u. Pharmakologie
222, 1/2 Heft, 169-171 (1954)
40. Wilhelmi, G. u. R. Pulver:
Untersuchungen zur Frage eines peripheren Angriffs-
punktes der Pyrazole bei der antiphlogistischen Wir-
kung.
Arzneimittelforschung 5, 221-224 (1955)
41. Wilhelmi, G.:
Die pharmakologischen Eigenschaften der Metabiliten
von 1,2 Diphenyl - 3,5 - dioxo - 4n - butyl - pyrazo-
lidin.
Arzneimittelforschung 10, 129-133 (1960)
42. Yourish, N., B. Paton, B.B. Brodie u. J.J. Burns:
Effect of phenylbutazone (Butazolidin) on experimen-
tally induced ocular inflammation.
Arch. Ophthal. 53, 264 (1955)

II. PROBLEMSTELLUNG

In letzter Zeit wurden mehrfach Untersuchungen durchgeführt, die in Erfahrung bringen sollten, ob der Stoffwechsel der Linse durch Substanzen beeinflusst werden kann, die als Therapeutika in der Ophthalmologie von großer Bedeutung sind. Klinische Beobachtungen über eine Beeinträchtigung der Transparenz der Augenlinsen bei der Anwendung bestimmter Pharmaka zur Therapie von Augenerkrankungen waren hierzu der Anlaß. In erster Linie sind hier die Nebenwirkungen bei der örtlichen Pilocarpintherapie beim Glaukom und der örtlichen Cortisontherapie bei Entzündungen zu erwähnen. Linsentrübungen, die bei Anwendungen des in Schlankheitsmedikamenten enthaltenen Dinitrophenols auftraten, sind schon seit langem bekannt. Diese Beobachtungen der Humanmedizin konnten zum Teil im Tierversuch experimentell wiederholt werden.

In letzter Zeit sind neben spaltlampenmikroskopischen Untersuchungen auch Analysen des biochemischen Geschehens in solchen Linsen durchgeführt worden. Dabei konnte fast immer eine Abweichung des Kohlenhydratstoffwechsels vom Normalverhalten bei der Trübungsentstehung gefunden werden (HOCKWIN u. KLEIFELD). Die Erzeugung experimenteller Katarakte im Tierversuch gelang manchmal jedoch nur, wenn die Widerstandskraft der Linsenfasern zur Aufrechterhaltung ihrer Durchsichtigkeit durch andere Einflüsse bereits geschwächt worden war. Während man z. B. durch Pilocarpinverabreichung an gesunden Kaninchenaugen keine Linsentrübung erzeugen kann, gelingt dies jedoch immer dann, wenn

vor der Pilocarpinapplikation z. B. durch Kammerwasserpunktion, Verfütterung einer nicht kataraktogenen Naphthalindosis oder Bestrahlung mit einer Röntgendosis, die unterhalb des sogenannten Schwellenwertes der Röntgenstrahlenkatarakt liegt, eine Vorschädigung des Linsenstoffwechsels stattgefunden hatte. HOCKWIN et al. sprechen für diese Art der Kataraktentstehung von einer Additionsfähigkeit unterschwelliger Katarakttoxinen. Man nimmt als Deutung der oben genannten Befunde an, daß auch die Einwirkung bestimmter Pharmaka auf den normalen Linsenstoffwechsel eine unterschwellige Dosis für eine Linsentrübung darstellen kann. Die Augenerkrankung selbst, die zu der Therapie mit einem der oben genannten Medikamente führt, ist dabei ebenfalls als eine unterschwellige Kataraktdosis anzusehen, die allein jedoch keine Linsentrübung zu produzieren vermag.

Verschiedene Beobachtungen weisen darauf hin, daß eine unterschwellige Schädigung der Linse von ihr gespeichert werden kann. Der Mechanismus dieser Speicherung ist noch unbekannt; da aber bei fast allen Noxen eine Wirkung auf den Kohlenhydratabbau zu finden ist, kann angenommen werden, daß dieser Stoffwechselweg für eine dauernde Speicherung einmal erfolgter Schädigungen wichtig ist. Gehen die gespeicherten Schäden sinngemäß einher mit den durch das Altern bewirkten Stoffwechselveränderungen der Linse, so könnten sie für die Genese der Cataracta praesenilis sehr bedeutsam sein.

Zweck dieser Arbeit war es nun, die Stoffwechselvorgänge der Linse unter Einwirkung des Oxyphenylbutazons ("Tande-

ril"), welches in der Ophthalmologie hauptsächlich bei entzündlichen Reiz- und Schwellungszuständen des Auges zur Anwendung kommt, festzustellen.

Die Untersuchungen werden ausschließlich an Kälber- und Rinderlinsen vorgenommen und erstrecken sich im wesentlichen auf die Substrate des Kohlenhydratstoffwechsels, auf dessen Fermente und auf die energiereichen Adenosinnucleotide. Hier wird vor allen Dingen deshalb der Kohlenhydratstoffwechsel beobachtet, da seine Intaktheit für mehrere Aufgaben der Linse und u. a. für die Aufrechterhaltung der normalen Durchsichtigkeit Voraussetzung ist. Ist der Kohlenhydratabbau gestört, kommt es zwangsweise z. B. zu einer Erniedrigung der energiereichen Nucleotide, die zu einer Störung sämtlicher energiefordernder Prozesse führt.

III. LITERATUR

a) Allgemeine Pharmakologie der Pyrazole und Pyrazolidine (8, 17, 29, 35, 40).

Die Kenntnisse über die pharmakologischen und therapeutischen Eigenschaften der Pyrazole reichen bis in das vergangene Jahrhundert zurück. Zunächst waren es Phenazon und Dipyrin, die im Vordergrund des Interesses standen. Das Dipyrin wurde anfangs nur wegen seiner antipyretischen und analgetischen Wirkungen verwendet, die charakteristischen entzündungshemmenden Qualitäten wurden erst später von Eppinger aufgedeckt.

Durch weitere Untersuchungen wurde dann die Synthese einiger als Na-Salze sehr gut H_2O - löslicher Pyrazonderivate ermöglicht, ohne daß sich in therapeutischer und pharmakologischer Hinsicht neue Aspekte ergaben (z. B. Metamizol).

Die Suche nach weiteren Präparaten in der Pyrazolreihe wurde daher in der Hoffnung, Derivate mit noch ausgeprägteren und andersartigen Eigenschaften zu finden, fortgesetzt.

So entstanden später die gut H_2O - löslichen Pyrazolidine, die auf Grund ihrer Zugehörigkeit zur Gruppe der Pyrazole zunächst auf ihre analgetische und antipyretische Wirkung untersucht wurden. Das neu entwickelte Pyrazolidin "Butazolidin" übertraf dabei im pharmakologischen Versuch den antipyretischen Effekt der oben genannten löslichen Pyrazone, es blieb jedoch bezüglich

der analgetischen Qualitäten hinter Dipyrin zurück. Aus diesem Grund wurde aus den beiden Medikamenten das unter dem Namen "Irgapyrin" bekannte Mischpräparat hergestellt. Seitdem sind viele Veröffentlichungen über Irgapyrin und Butazolidin erschienen. Beide Präparate zeigen eine überaus intensive antiphlogistische Wirkung, zu deren Prüfung zahlreiche experimentelle Anordnungen herangezogen wurden. Insbesondere wurde versucht, klinische Entzündungsbilder zu imitieren (z.B. akute Erytheme, Ödeme, Exsudationsprozesse, nekrotisierende und chronische proliferative Entzündungen), um diese dann antagonistisch zu beeinflussen (WILHELM, PULVER). Dabei galt das Interesse vor allem dem Mechanismus der antiphlogistischen Wirkung. So wurden Untersuchungen über den Einfluß von Butazolidin auf die Permeabilität, Fragilität und Motorik der Kapillaren, sowie auf die Permeabilität anderer Membranen und Grenzflächen durchgeführt. Ebenso prüfte man die Einwirkung des Präparates auf die Zellfunktionen (RECHENBERG). Für die vorliegende Arbeit ist speziell die Wirkung des Butazolidins auf den Linsenstoffwechsel zu erwähnen (KLEIFELD, HOCKWIN). Diese Versuche zeigten, daß bei Linsen, die 2 Stunden in einer Butazolidin (10^{-3} molar) und anorganisches ^{32}P enthaltenden Nährlösung aufbewahrt wurden, eine Verschiebung im ^{32}P - Elektrophoresediagramm auftrat, wobei es zu einer Verminderung des Restphosphates und des AT^{32}P kam. Der Milchsäuregehalt der beeinflussten Linsen war gegenüber der Kontrolle vermehrt. Die Untersuchungen zeigten also eine Beeinflussung der Glykolyse in der Linse.

Über die Entwicklung eines weiteren Pyrazolidins, des p - Hydroxyphenylbutazons, und über seine pharmakologischen Eigenschaften wird im nächsten Abschnitt die Rede sein.

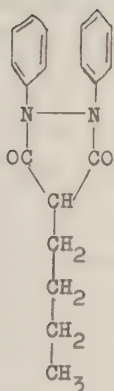
b) Oxyphenylbutazon als Stoffwechselprodukt des Butazolidins (4, 11, 28, 41).

Die Entwicklung des "Tanderils" war erst möglich, nachdem Burns und Brodie wichtige Beiträge über den Butazolidinstoffwechsel geliefert hatten. Ihnen gelang es, zwei Stoffwechselprodukte des Butazolidins aus dem menschlichen Harn in reiner Form zu isolieren, die ähnliche Eigenschaften zeigten, wie die Muttersubstanz. Einer dieser beiden Stoffe, der sogenannte Metabolit I, ist mit dem Oxyphenylbutazon identisch. Beide Substanzen (BM I u. BM II) entstehen im Organismus durch Hydroxylierung des Butazolidins.

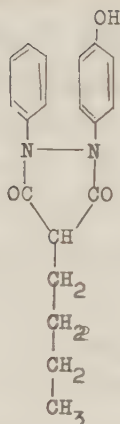
Die Metaboliten I und II unterscheiden sich insofern, als

- a) bei BM I die Hydroxylierung am Phenylkern in p-Stellung erfolgt ist, während bei dem
- b) BM II die Hydroxylierung in der Seitenkette stattgefunden hat.

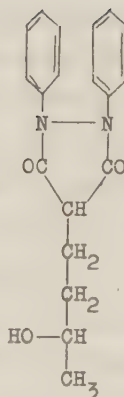
Die FORMELN für diese Substanzen lassen sich wie folgt darstellen:



Butazolidin



BM I



BM II

M = 325

Von den beiden Metaboliten steht mengenmäßig der erste im Vordergrund. Im Plasma von Patienten beträgt sein Anteil 30 - 50 % des Gesamtblutspiegels (11). Bei Versuchstieren kann er sogar die Konzentration des Butazolidins im Blut wesentlich überschreiten.

Dagegen wird der BM II im Intermediärstoffwechsel nur in kleinen Mengen gebildet. Das Phenolderivat verschwindet wie Butazolidin relativ langsam aus dem Körper des Menschen. Die biologische Halbwertszeit beträgt für BM I 2 Tage, für BM II dagegen nur 10 Stunden (4). BM I erweist sich damit, pharmakologisch gesehen, als das wichtigere Stoffwechselprodukt und dürfte auch vorwiegend für die Wirkung des Butazolidins verantwortlich sein. Zur Charakterisierung der pharmakologischen Eigenschaften wurden die

Metaboliten in ähnlicher Weise wie Butazolidin und andere Pyrazole hinsichtlich ihrer antiphlogistischen, antipyretischen und analgetischen Eigenschaften untersucht (40). Dabei wurde festgestellt, daß sich Butazolidin in den verschiedenen pharmakologischen Tests seinen Metaboliten überlegen zeigt. Einzig BM I übertrifft den Effekt des Butazolidins bei einigen Versuchsmethoden (z.B. beim Granulombeuteltest der Ratte). BM I besitzt im Gegensatz zu Butazolidin keine sichere analgetische Wirkung. Hervorragend dagegen ist die antiphlogistische Wirkung des Phenolderivates. So ist es z. B. beim Granulombeuteltest, einer chronisch proliferativen Entzündung, und im Spätstadium der Formalinperitonitis bei der Ratte der Muttersubstanz in der antiphlogistischen Wirkung überlegen.

Der Metabolit I, der als Medikament unter dem Namen „Tanderil“ bekannt ist, wird in der Therapie hauptsächlich bei

- 1) Posttraumatischen Entzündungs- und Schwellungszuständen,
- 2) Nichttraumatischen Entzündungen des Bewegungsapparates,
- 3) Postoperativen Entzündungs- und Schwellungszuständen,
- 4) Unspezifischen Entzündungen der Adnexe und des Beckenbindegewebes,
- 5) Entzündungen der Blut- und Lymphgefäße,
- 6) Entzündungen im Augenbereich

appliziert.

c) Oxyphenylbutazon (Tanderil) in der Augenheilkunde (2, 9, 10, 15, 19, 21, 25, 27, 32, 33, 38, 42)

Die Muttersubstanz des Oxyphenylbutazons, das Butazolidin, spielt in der Augenheilkunde als Antiphlogistikum und Analgetikum bei extra- und intraokularen Reizzuständen schon seit längerem eine wesentliche Rolle.

Nachdem der Stoffwechsel des Butazolidins erforscht worden und die Synthese des BM I gelungen war, wurden mit Oxyphenylbutazon in der Therapie erwartungsgemäß vor allem dort Erfolge erzielt, wo es auf eine örtliche oder allgemeine Entzündungshemmung oder Fiebersenkung ankam. In der Ophthalmologie findet das Tanderil seitdem Anwendung bei endogen und exogen bedingten entzündlichen Erkrankungen der vorderen Augenabschnitte (2), weiterhin bei der Behandlung postoperativer Reiz- und Schwellungszustände (10,15). Untersuchungsergebnisse ließen erkennen, daß das Tanderil sowohl bei parenteraler Applikation im Tierversuch (42) als auch bei Verabfolgung per os beim Menschen beim Vorliegen von entzündlichen Reizerscheinungen im Augenbereich günstige antiphlogistische Effekte auszuüben vermag. Vor allem bei exogenen Entzündungen, wenn es sich um Hornhautfremdkörper mit Begleitiritis handelte, wurden sehr gute Erfolge erzielt. Bei exogenen Entzündungen erwies sich p-Hydroxyphenylbutazon in der Behandlung der Skleritis und Episkleritis als sehr wirksam. Die beim Vorhandensein von akuter und subakuter Iritis erzielten Behandlungserfolge zeigten deutlich, daß bei der Mehr-

zahl der behandelten Patienten ein promptes Abklingen der Entzündungserscheinungen erreicht werden konnte. Als weiteres Beispiel kann man die durch subkonjunktivale Bienengiftinjektion am Kaninchen erzeugte Keratoiritis heranziehen. Hier konnte durch eine einmalige Injektion von 50 mg Tanderil pro kg Körpergewicht eine statistisch signifikante Abnahme der stark erhöhten Eiweißwerte im Kammerwasser, sowie ein deutlicher Rückgang der äußeren Reizerscheinungen erreicht werden (26).

SMITH konnte den antiphlogistischen Effekt des Oxyphenylbutazons im Doppelblindversuch an operierten Patienten nachweisen. Von 126 wegen Katarakt oder Strabismus operierten Patienten erhielten 50 % Oxyphenylbutazon, die anderen 50 % Placebos. Durch Ärzte und Pflegepersonal erfolgte dann eine Kontrolle der Patienten hinsichtlich der postoperativen Schmerzen, Schwellung und Rötung. Dabei zeigte sich, daß Oxyphenylbutazon v. a. Dingen postoperative Schwellungszustände günstig beeinflusst und die Rückbildung dieser Schwellungen beschleunigt (32). Eine zusätzliche Verabreichung von Antibiotica, Corticosteroiden oder Diuretica verstärkt die antiphlogistische Wirkung des Tanderils bei entzündlichen Schwellungszuständen des Auges (33).

d) Physiologie und Pathologie des Linsenstoffwechsels.

Der normale Stoffwechsel der Linse läßt sich nach seinen Aufgaben untergliedern in den

- 1) Wachstumsstoffwechsel zur Bereitstellung von Baustoffen und zur energetischen Ermöglichung des Wachstums,

- 2) Erhaltungsstoffwechsel, der die Energie zur Resorption, zum Auf- und Abbau von Linseneiweißkörpern und zur Aufrechterhaltung des Konzentrationsgefälles zwischen Linse und Kammerwasser und vor allem zur Erhaltung der Transparenz bereitstellt,
- 3) bisher noch nicht gesicherten Funktionsstoffwechsel, der eventuell im Rahmen des intraokularen Akkommodationsmechanismus eine wesentliche Rolle spielt.

Der Energiehaushalt der Linse wird vorwiegend durch den Kohlenhydratstoffwechsel gedeckt, so daß dessen Störung eine Gefahr für sämtliche energieverbrauchenden Prozesse darstellt. Der "normale Stoffwechsel" der Linse unterliegt stets Schwankungen. Das Wachstum der Linse, die Anpassung an sich ändernde Umweltbedingungen und schließlich auch das Lebensalter spielen dabei eine wesentliche Rolle. Aus zahlreichen Arbeiten (7, 14, 16, 23, 24, 36) ist bekannt, daß vor allem das Alter der Linse den Stoffwechsel maßgeblich verändert, so daß auch hierin die Altersabhängigkeit der experimentellen Katarakterzeugung zu suchen ist. Untersuchungen haben nämlich gezeigt, daß unterschiedlich alte Linsen auf dasselbe kataraktogene Agens verschieden reagieren. Bei genaueren Untersuchungen zeigt es sich, daß im Alter nicht nur die Intensität des Stoffwechsels nachläßt, wie es z. B. an der Abnahme der Fermentaktivitäten zu erkennen ist (37), sondern grundsätzliche qualitative und quantitative Änderungen auftreten. Schon vor ungefähr 30 Jahren wurde beschrieben, daß in der alternden Linse der Vitamin C Gehalt abnimmt (24), Verschiebungen im Gehalt an

schwer hydrolysierbaren Phosphatfraktionen eintreten, und die Aufnahme von radioaktiv markiertem Phosphat in die Linse verlangsamt abläuft (MÜLLER). Weiterhin sinkt der Milchsäurespiegel, der Zucker- und O_2 -Verbrauch wird geringer, und es kommt zu einer Verminderung der Energiebereitstellung. Besonders verlangsamt ist im Alter die Glykolyse- und Eiweißsynthese. Eine Kataraktbildung im Alter beruht vor allem auf einer Störung der Eiweißsynthese, die primär durch einen Mangel an essentiellen Aminosäuren oder sekundär durch eine Störung des Mineral- und Kohlenhydratstoffwechsels hervorgerufen sein kann. Die Störung des Kohlenhydratstoffwechsels geht mit einer verminderten Bildung der energiereichen Adenosinnucleotide einher. Der so auftretende Energiemangel bei der Eiweißsynthese kann die Kataraktbildung begünstigen (MÜLLER, HOCKWIN, DARDENNE). Der Abbau der Kohlenhydrate in der Linse, auf den sich die Untersuchungen dieser Arbeit im wesentlichen erstrecken, verläuft über verschiedene Wege:

- 1) Glykolyse
- 2) Pentoseshunt
- 3) Sorbitolweg
- 4) Zitronensäurezyklus

Der Verlauf der Glykolyse und seine Mündung in den Zitronensäurezyklus entspricht dem anderer Körperzellen (Abb. 1). Die Glucose stammt zum größten Teil aus dem Kammerwasser, zum anderen aus dem in der Linse in geringen Mengen gebildeten Glykogen. Bei dem Pentoseshunt und dem Sorbitolweg handelt es sich wahrscheinlich um Regulationsmechanismen, die zur Energieausbeute in der Glykolyse und im

Zitronensäurezyklus verwendet werden können. Der Pentoseshunt hat weiterhin die übliche Funktion der Pentosenbildung, die zum Aufbau der Nucleinsäuren notwendig sind, zum anderen wird in Gestalt des TPNH noch aktiver Wasserstoff gebildet.

Der Abbau über das Sorbitol gibt dem Linsenstoffwechsel die Möglichkeit, phosphorylierte Kohlenhydrate zu erzeugen, ohne daß die ersten Schritte der Glykolysekette durchlaufen werden müssen. Außerdem wird TPN gebildet.

Die Energieausbeute der Glykolyse beträgt 2 Mol ATP/Mol Glucose. Außerdem wird ein energiereiches Substrat, die Brenztraubensäure, gebildet, die bei Sauerstoffanwesenheit zum weiteren Abbau zur Verfügung steht. In der Atmungskette können dann weitere 36 Mol ATP/Mol Glucose gewonnen und zur Erhaltung, zum Wachstum und zur Funktion der Linse zur Verfügung gestellt werden.

Die Fermente und Substrate des Kohlenhydratstoffwechsels, die bei den hier durchgeführten experimentellen Untersuchungen berücksichtigt werden, sind aus der Abb. 1 zu entnehmen.

e) Die Biochemie der Entzündung

Da Tanderil, wie ja schon erwähnt wurde, am Auge im wesentlichen bei entzündlichen Veränderungen appliziert wird, ist es sicherlich von Bedeutung, zunächst einmal einige fermentchemische Untersuchungen über die Entzündung und deren Beeinflussung zu erwähnen. Gesichert ist, daß

- 1) der O_2 -Verbrauch in einem entzündlich veränderten Gewebsbezirk herabgesetzt ist (18),
- 2) fermentchemisch sich eine Störung mehrerer oxydativ assimilatorischen Reaktionen nachweisen läßt,
- 3) anoxydativ dissimilatorische Vorgänge gesteigert ablaufen, und die Pasteur'sche Reaktion demnach gehemmt ist (Glykolyse-Aktivierung).

Die Hemmung der Pasteur'schen Reaktion erfolgt durch die Aufhebung der lockeren Bindung zwischen Atmungsketten - und Substratkettenphosphorylierung. Die Entkopplung tritt mit der Hemmung der Atmungskettenphosphorylierung auf. Dadurch kommt es vor allem zu einer Störung der Energieverwertung, die sich in einer erhöhten Wärmeproduktion bemerkbar macht (statt mechanischer Energie wird mehr Wärme gebildet). Wie bereits erwähnt, tritt in den entzündlichen Gewebsbezirken eine Glykolysesteigerung auf, während die Hemmung des Stoffwechsels im oxydativen Abbau und somit in der Atmungskettenphosphorylierung zu suchen ist.

Das physiologische Verhältnis von Substrat- und Atmungskettenphosphorylierung ist also, auf Grund anoxydativer Steigerungen einerseits und oxydativer Verluste andererseits, zu Gunsten der Substratkettenphosphorylierung verschoben. Dieses nun entstandene pathologische Ungleichgewicht äußert sich also in einer unkontrollierten, gesteigerten Dissimilation.

Die von MÜNICH (26) festgestellte Mehraufnahme von radioaktivem Phosphor in die überlebende Kaninchenhornhaut im Anfangsstadium einer Bienengiftkeratitis steht offenbar im

Zusammenhang mit dieser Aktivierung der Substratkettenphosphorylierung. Weiterhin ist die notwendige Folge der Glykolysesteigerung, daß es in dem Entzündungsbereich zu einer Ansammlung von Glykolyseendprodukten wie Milchsäure und Brenztraubensäure kommt.

Aus dem bisher Gesagten geht hervor, daß eine Entzündungstherapie im fermentchemischen Bereich es darauf absehen muß, die zu stark aktivierte Glykolyse wieder zu normalisieren. Versuche mit experimentell erzeugten Entzündungen haben gezeigt, daß Phosphatasehemmer wie Monojodessigsäure, Natriumfluorid, Phloridzin in Konzentrationen, die keine Atmungsschädigung zur Folge haben, antiphlogistisch wirken, indem sie bestimmte Fermentreaktionen der Glykolyse hemmen (bei Bienengiftkeratitis, Formalinarthrititis). Bei der antiphlogistischen Wirkung des Cortisons wurde ebenfalls eine Glykolysehemmung nachgewiesen, die sich vor allem durch eine verringerte P32 Aufnahme der überlebenden Kaninchenhornhaut gegenüber der Kontrolle bemerkbar machte.

Zu entsprechenden Ergebnissen kamen auch HILLER und STRAUSS (12), die die Stoffwechselwirksamkeit von Pyrazolonderivaten an Leberhomogenaten untersuchten. Dabei wurde festgestellt, daß sowohl der Umsatz von Fruktose als auch die Dehydrierung des $\text{DPNH} + \text{H}^+$ durch diese Therapeutika drastisch gehemmt wird. Diese Substanzen müssen demnach den Kohlenhydratstoffwechsel in irgendeiner Weise blockieren. Dies geschieht wahrscheinlich über die Inaktivierung von Fermenten.

Bei allen im experimentellen Teil dieser Arbeit folgenden Untersuchungen geht es stets um die Frage, ob Tanderil einige dieser Forderungen bei der Entzündungstherapie erfüllt, wobei stets berücksichtigt werden muß, daß die Beeinflussung sich hier an gesundem Gewebe vollzieht.

Außer dieser im fermentchemischen Bereich ansetzenden antientzündlichen Wirkung der Pyrazole wurde lange Zeit ein anderer Wirkungsmechanismus dieser Substanzen diskutiert. Zunächst war man der Meinung, daß Substanzen dieser Art in das Hypophysen-Nebennierensystem eingreifen, jedoch ist dieser Weg nicht mehr wahrscheinlich, seit WILHELM (39) nachweisen konnte, daß Entzündungen auch bei adrenaletomierten Tieren durch diese Stoffe gehemmt werden.

Bekannt ist weiterhin, daß es im allergischen Organismus durch ablaufende Antigen - Antikörperreaktionen zu einer Freisetzung des toxischen Histamins kommt, so daß eine histaminantagonistische Wirkung der Pyrazole sicherlich von Bedeutung ist.

Der antiphlogistische Effekt beruht unter anderem auf einer Herabsetzung der Kapillarpermeabilität, die für kolloidale Farbstoffe (z. B. Trypanblau) in gesundem und entzündlichen Gewebe nachgewiesen werden konnte.

IV. EXPERIMENTELLER TEIL

a) Nährlösungen

Für sämtliche Langzeitkultivierungen wurde als Nährlösung TC Medium 199 von der Fa. Difco verwendet. Der End - pH dieser mit Luftsauerstoff gesättigten Lösung beträgt 7,4. Die Zusammensetzung der zur Herstellung der Lösung notwendigen Trockensubstanz ist aus Tabelle 1 zu entnehmen. In 100 ml H₂O-Bidest wurden folgende Substanzen gelöst: 1,1 g TCM 199 Trockensubstanz, 35 mg NaHCO₃, 50 mg Streptomycin und 50 000 I.E. Penicillin.

Die Hälfte der Nährlösung wurde dann mit einer bestimmten Menge Oxyphenylbutazon (OPB) versetzt, welches vorher in einer Konzentration von 10^{-1} bzw. 10^{-2} molar hergestellt worden war (2ml einer 10^{-1} molaren Lösung auf 20 ml Nährlösung ergibt eine 10^{-2} molare OPB Konzentration, 0,2 ml einer 10^{-2} molaren OPB-Lösung auf 20 ml Nährlösung ergibt eine 10^{-4} molare OPB Konzentration). Da das Oxyphenylbutazon jedoch lediglich unter Zusatz von einigen Tropfen KOH in Lösung ging, war es notwendig, die durch die Kalilauge hervorgerufene pH-Verschiebung der einen Nährlösungshälfte durch Zugabe einer entsprechenden Menge Essigsäure (10 %) wieder auszugleichen. Von dieser Nährlösung wurden dann je 20 ml in sterile Erlenmeyerkolben gefüllt, in denen die Kultivierung der Linsen stattfand. In der Hälfte der Kolben befand sich somit reine Nährlösung, während die andere Anzahl zusätzlich zur Nährlösung eine bestimmte Menge OPB enthielt.

b) Gewinnung des Linsenmaterials, Linsenpräparation und
Aufarbeitung der Linsen für die einzelnen Bestimmungs-
methoden.

Für sämtliche hier aufgeführten Versuche wurden Augen von Kälbern und Rindern verwendet, die bis zu 10 Min. nach dem Tode der Tiere aus der Orbita herausgenommen und in DEWAR - Gefäßen unter Eiszusatz ins Labor transportiert wurden. Die Gewinnung der zu den Versuchen notwendigen Linsen geschah folgendermaßen:

Die vom Schlachthof geholten Augen wurden zunächst von anhängendem Fett- und Muskelgewebe befreit, in eine verdünnte Jodtinktur getaucht und anschließend mit steriler physiologischer Kochsalzlösung abgespült. Danach wurden die Augenpaare auf Petrischälchen gelegt, die Vorderkammer durch einen Hornhautschnitt in Limbusnähe mit einer Rasierklinge eröffnet und die Hornhaut mit einer Schere abgeschnitten und entfernt. Anschließend erfolgte die zirkuläre Abtrennung der Iris mit einer Pinzette, so daß dann die Linse unter vorsichtiger Durchtrennung der Zonula entnommen werden konnte. Vor dem nun folgenden Wägen wurden Iris-, Glaskörper- und Zonulareste vorsichtig mit Fließpapier beseitigt. Nach dem Wägen wurde jede Linse in ein Erlenmeyerkölbchen gegeben, das mit je 20 ml Nährlösung gefüllt war. Da in die Hälfte der Erlenmeyerkolben zusätzlich zur Nährlösung Oxyphenylbutazon in einer bestimmten Konzentration (10^{-2} bzw. 10^{-4}) hinzugegeben worden war, stand also jeweils eine Linse eines Linsenpaares während der nun folgenden Kultivierung unter dem Einfluß des Oxy-

phenylbutazons, während die andere Linse lediglich in reiner Nährlösung lag und somit zum paarweisen Vergleich herangezogen werden konnte. Die Kultivierungszeit betrug 24 Stunden bei einer Temperatur von 37°C . Nach dieser Zeit wurden die Linsen aus der Nährlösung herausgenommen, mit physiologischer Kochsalzlösung abgespült, mit Fließpapier getrocknet und abermals gewogen.

Zur Bestimmung der energiereichen Adenosinnucleotide, der Gesamtphosphate und der Glykolysezwischenprodukte (Glucose, Glucose-6-phosphat, Fruktose, Fruktose-1,6-Diphosphat, Brenztraubensäure, Dihydroxyacetonphosphat und Milchsäure) wurden die Linsen folgendermaßen weiter verarbeitet:

Zunächst wurden sie mit 10 ml 6% HClO_4 enteiweißt und homogenisiert, danach 20 Minuten bei 19600g zentrifugiert, das Dekantat dann mit 2 n NaOH neutralisiert und abermals auf die gleiche Weise zentrifugiert. Die nach der Zentrifugation gewonnenen Überstände (Linsenextrakte) wurden dann in Meßzylinder dekantiert und auf ein für jede Linse gleiches Ausgangsvolumen (GV) aufgefüllt. Mit diesen neutralisierten und enteiweißten Linsenextrakten wurden dann die oben aufgeführten Bestimmungen durchgeführt.

Die Bestimmung der Fermente erfolgte im wässrigen Homogenat. Nach Zusatz von 0,05 ml Bidest / 1 mg Linsengewebe wurde mit dem Ultra-Turrax 18,2" bei 20 000/Min. homogenisiert. Das Homogenat wurde 1 Std. bei 19600g in der Kühlzentrifuge zentrifugiert. Der dabei gewonnene

klare Überstand wurde zur Bestimmung der einzelnen Enzymaktivitäten des KH-Stoffwechsels herangezogen. Zur Bestimmung der Aktivitäten von ALD, LDH, TIM wurde das Dekantat im Verhältnis von 1 : 5 mit Aqua bid. verdünnt.

Folgende Fermentaktivitäten wurden bestimmt (in Klammern die im weiteren Text benutzten Abkürzungen):

1. Aldolase (ALD)
2. Lactatdhydrogenase (LDH)
3. Malatdehydrogenase (MDH)
4. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase (G-6-PDH)
5. Sorbitdehydrogenase (SDH)
6. Triosephosphatisomerase (TIM)
7. Pyruvatkinase (PK)
8. Hexokinase (HK)
9. Glycerokinase (GK)

Im folgenden Text werden weitere Abkürzungen benutzt, die hier erklärt werden sollen:

Adenosintriphosphat: ATP

Adenosindiphosphat: ADP

Adenosinmonophosphat: AMP

Brenztraubensäure: BTS

Dihydroxyacetonphosphat: DAP

Diphosphopyridinnucleotid: DPN

Diphosphopyridinnucleotid reduziert: DPNH + H⁺

Fruktosediphosphat: FDP

Glycerinaldehydphosphat: GAP

Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase: GAPDH

Glycerinphosphatdehydrogenase: GDH

Glutamat - Oxalacetat - Transaminase: GOT

Glucose-6-phosphat: G-6-ph

Milchsäure: MS

Magnesiumsulfat: MgSO_4

Magnesiumchlorid: MgCl

Myokinase: Mk

Phosphoenolpyruvat: P-BTS

Phosphoglyceratkinase: PGK

3 Phosphoglycerat: 3-PG

1,3 Diphosphoglycerat: 1,3-PGP

Phosphoglucoseisomerase: PGI

Triphosphopyridinnucleotid: TPN

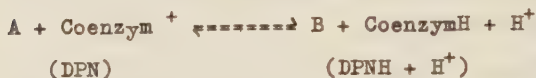
Triphosphopyridinnucleotid reduziert: $\text{TPNH} + \text{H}^+$

c) Allgemeines zur Ausführung enzymatischer Testmethoden.

Unter enzymatischer Analyse wird heute im allgemeinen die Analyse mit Hilfe von Enzymen verstanden. Diese Bestimmungsmethode wurde vor ca. 30 Jahren von Otto Warburg auf der Basis der Lichtabsorption der hydrierten Coenzyme Diphospho- und Triphosphopyridinnucleotid entwickelt. Gemessen wird bei den enzymatischen optischen Testmethoden die Lichtabsorption eines der an der Reaktion teilnehmenden Coenzyme oder Substrate, wobei die Absorption des reduzierten $\text{DPNH} + \text{H}^+$ mit einem Extinktionsmaximum bei 340 nm am häufigsten zu Messungen dieser Art herangezogen wird. Der besondere Wert der Enzyme besteht darin, daß sie in der Lage sind, einzelne Stoffe aus einem Stoffgemisch spezifisch zu erfassen und umzusetzen. Die weitaus größte Verwendung finden bei diesen enzymatischen Analysen DPN und TPN - abhän-

gige Dehydrogenasen:

Müßte z. B. die Substanz A bestimmt werden, so könnte man folgende Reaktion durchführen:



Die Übertragung des Substratwasserstoffes auf den Pyridinring von DPN bzw. TPN kann photometrisch über die Messung der Lichtabsorption registriert werden. So läßt sich also an der Extinktionsänderung bei 366 nm die enzymatische Umsetzung des Substrates A in der Photometerküvette direkt verfolgen. Bei einem Lichtweg von $d = 1$ wäre dann nach den Lambert-Beerschen Gesetz:

$$\log \frac{I_0}{I} = e \cdot c \cdot d$$

I_0 = Intensität des einstrahlenden Lichtes

I = Intensität des aus der Meßküvette austretenden Lichtes

e = Extinktionskoeffizient

c = Konzentration des lichtabsorbierenden Stoffes

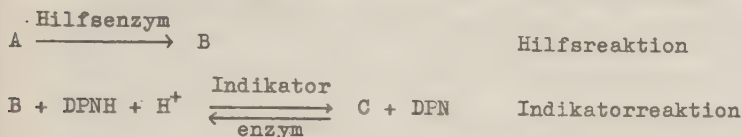
d = Schichtdicke der Meßküvette

Unsere Messungen wurden mit einem Eppendorf-Photometer bei einer Wellenlänge von 366 nm durchgeführt.

Da DPN in der oxydierten Form (DPN^+) im Wellenbereich von 300 - 400 nm keine Absorption zeigt, können die zahlreichen Dehydrogenasenreaktionen, deren Coenzym DPN oder TPN ist, durch die Zu- oder Abnahme der Extinktion bei 340 oder 366 nm mit dem UV-Photometer verfolgt werden.

Die enzymatische Analyse ist nun jedoch keineswegs auf Substrate beschränkt, die von DPN oder TPN- abhängigen

Dehydrogenasen umgesetzt werden können. Oft kann man zuvor die zu bestimmende Substanz A mit einem Hilfsenzym in ein Produkt B überführen (Hilfsreaktion). Das Substrat B kann dann durch eine DPN - abhängige Dehydrogenase wie üblich in der sogenannten Indikatorreaktion bestimmt werden:



Nach diesem Schema läßt sich z. B. ADP bestimmen, wie später noch genau gezeigt wird. Das Indikatorenzym ist in diesem Fall meistens eine DPN oder TPN - abhängige Dehydrogenase.

Bei allen Messungen muß unterschieden werden zwischen

a) der Aktivitätsbestimmung eines Enzyms

(die Aktivität eines Enzyms ist definiert durch die Geschwindigkeit der durch das Enzym katalysierten Reaktion; hier ist also bei der Messung die mechanische Geschwindigkeit, mit der der Photometerzeiger über die Skala wandert, ein Maß für die Geschwindigkeit der Reaktion.

und

b) der Mengenbestimmung biologisch interessierender Substanzen, besonders von Coenzymen und Substraten (Brenztraubensäure, Milchsäure usw.)

Hierbei handelt es sich um eine Endwertbestimmung. Während im ersten Fall (a) unter Substratüberschuß gearbeitet wird, handelt es sich bei dieser Bestimmung um eine Messung unter Enzymüberschuß. Das hinzugesetzte Indikatoren-

zym setzt den gesamten zu bestimmenden Stoff um. Wenn alles Substrat verbraucht ist, kommt es zum Stillstand der Reaktion, so daß nun die erfolgte Extinktionsänderung gemessen werden kann.

d) Bestimmung der einzelnen Fermente und Substrate.

Die nun folgenden Erläuterungen zu den einzelnen Testmethoden sollen vor allem das Prinzip der jeweiligen Bestimmung darlegen. Die genauen quantitativen Ferment-, Puffer- und Substratzugaben entsprechen zum größten Teil den Testvorschriften "Biochemica Boehringer", die den einzelnen Testpäckchen beiliegen.

1) Adenosintriphosphat

ATP gehört in die Reihe der gruppenübertragenden Coenzyme. Es ist ein Nucleotid und enthält zwei energiereiche Bindungen, durch die es ein relativ hohes Gruppenübertragungspotential besitzt. Die Bildung von ATP im Stoffwechselgeschehen findet hauptsächlich in der Atmungskette in Form der "oxydativen Phosphorylierung" statt. Hier in der Atmungskette, die in den Mitochondrien lokalisiert ist, wird die bei der Oxydation freierwerdende Energie abgefangen und in Form von ATP gespeichert. Diese gespeicherte Energie vermag der Organismus dann bei Bedarf durch die Überführung des ATP in ADP bzw. AMP wieder freizumachen. ATP steht also im Mittelpunkt zwischen energieaufnehmenden und energieliefernden Prozessen.

Da bei der Mehrzahl aller dissimilatorischen und assimilatorischen Vorgänge Energie umgesetzt wird und

dabei besonders die Adenosinphosphorsäuren auf- und abgebaut werden, ist es verständlich, daß gerade diese Substanzen beim pathologischen Stoffwechsel häufig verändert sind.

Bestimmungsprinzip

Es handelt sich um eine Messung mit Hilfe gekoppelter Reaktionen.

- a) Hilfsreaktion: Das Enzym Phosphoglyceratkinase katalysiert die Reaktion



- b) Indikatorreaktion: Sie wird mit Hilfe des Indikatorfermentes GAPDH durchgeführt und dient zur Bestimmung des in der ersten Reaktion gebildeten 1,3-PG-P. Als Maß für die vorliegende ATP-Menge und als Meßgröße dient der $\text{DPNH} + \text{H}^+$ Verbrauch, der an der Extinktionsabnahme sichtbar wird:



Diese beiden Reaktionen lassen sich in folgender Gleichung zusammenfassen:



Lösungen (zur ATP-Bestimmung)

- I) 0,1 m Triäthanonaminpuffer pH 7,6
- II) Reduziertes Diphosphopyridinnucleotid (DPNH) 0,02 m
- III) Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase/Phosphatglyceratkinase (GAPDH/PGK) 4mg GAPDH/ml und 1mg PGK/ml

Die Messung erfolgt bei 360 Millimü, das Gesamtvolumen beträgt 2,56 ml

Es werden nacheinander in die Cuvette gegeben:

1,0 ml neutralisierter undenteiweißter Extrakt, 0,02 ml der Lösung II, 1,5 ml der Lösung I. Nach 30 Min. Wartezeit erfolgt die erste Messung der Extinktion, die als E_0 eingesetzt wird. Zur Überprüfung, ob keine Extinktionsänderung mehr stattfindet, wurde stets 5 Min. nach jeder Messung noch eine Kontrollmessung durchgeführt. Nach dieser ersten Messung erfolgt die Fermentzugabe von 0,04 ml GAPDH/PGK. Der zweite Extinktionswert wird dann nach einer weiteren Wartezeit von 30 Min. abgelesen. Die Differenz $\Delta E = E_0 - E_1$ geht in die Berechnung ein.

2) AMP und ADP

Hierbei handelt es sich um die energieärmeren Formen der Adenosinnucleotide, die aus ATP durch Abgabe eines Phosphatrestes entstehen können.

Bestimmungsprinzip

ADP wird zunächst durch P-BTS zu ATP phosphoryliert. Die Reaktion wird durch die PK katalysiert:



Es entsteht bei dieser Reaktion eine der ATP Konzentration äquivalente BTS Menge, die dann enzymatisch in der durch LDH katalysierten Reaktion



bestimmt wird. Die hierbei verbrauchte DPNH-Menge entspricht der umgesetzten ATP-Menge. Die DPNH-Abnahme wird photometrisch registriert.

Ist nun ADP vollständig zu ATP umgesetzt, kann man das

noch unverändert vorliegende AMP bestimmen, indem man es mit dem ATP, welches bei der ADP-Bestimmung gebildet wurde, in ADP überführt. Katalysiert wird diese Reaktion durch die MK:



Das entstehende ADP wird dann auf die oben beschriebene Weise bestimmt. Die im Reaktionsgemisch enthaltenen Reagentien reichen hierzu aus. Die Reaktion läuft ab, sobald sie durch MK gestartet wird.

Lösungen

- I) Triäthanolaminpuffer 0,5 m, pH 7,6
- II) Phospho-enol -brenztraubensäure (PBTS 0,01 m, KCl 1,3 m MgSO_4 0,4 m)
- III) Reduz. Diphosphopyridinnucleotid 0,005 m
- IV) Milchsäuredehydrogenase (LDH) 1mg/ml
- V) Pyruvatkinase (PK) 1mg/1m
- VI) Myokinase (MK) 2mg/ml

Zur Messung werden wiederum 10 mm Cuvetten verwendet. Das Gesamtcuvettenvolumen beträgt wie bei der ATP-Bestimmung 2,56 ml.

Folgende Lösungen werden nacheinander in die Cuvette pipettiert: 1 ml neutralisierter Linsenextrakt, 0,15 ml der Lösung II, 0,05 ml DPN-H, 0,02 ml MDH und 1,30 ml der Lösung I. Nach einer halben Stunde wird E_0 gemessen. Nach der Messung wird als Ferment 0,02 ml Pyruvatkinase hinzugegeben und dann wiederum 30 Min. gewartet. Nach dieser Zeit erfolgt die zweite Extinktionsmessung (E_1). Hiernach werden 0,02 ml des Fermentes Myokinase hinzugegeben und

nach einer weiteren Reaktionszeit von 30 Min. E_2 bestimmt.

Zur Berechnung von ADP wird $\Delta E_1 = E_0 - E_1$ verwendet, in die Berechnung von AMP geht $\Delta E_2 = \frac{E_1 - E_2}{2}$ ein.

3) Milchsäure

Die Milchsäure nimmt im Stoffwechselgeschehen eine zentrale Stellung ein. Sie entsteht am Ende der Glykolysekette mit Hilfe der Lactatdehydrogenase aus Brenztraubensäure. Da bei allen entzündlichen Veränderungen im Gewebe eine Glykolysesteigerung stattfindet, kommt es, wie später noch genau beschrieben werden soll, in diesen pathologisch veränderten Gewebsbezirken zu einer Anreicherung von Brenztraubensäure und Milchsäure.

Bestimmung

Die im Linsenhomogenat vorhandene Milchsäure wird unter Zugabe von Lactatdehydrogenase (LDH) und DPN^+ in Brenztraubensäure oxydiert. Das hierbei entstehende $DPNH+H^+$ dient als Meßgröße.



Das Gleichgewicht dieser Reaktion, welches normalerweise auf der Seite der Milchsäure liegt, wird auf die rechte Seite der Reaktionsgleichung verschoben, wenn die gebildete Brenztraubensäure durch Hydrazinzugabe abgefangen wird.

Lösungen:

- I) Glycinpuffer 2,0 m, pH 7,0, 1 m Hydrazin, Mg^{++} 0,002 m
- II) Diphosphopyridinnucleotid (DPN) 0,02 m

III) Lactatdehydrogenase (LDH) 2mg/ml

Das Gesamtcuvéttenvolumen beträgt 2,14 ml.

In die Cuvetten werden gegeben: 2,00 ml der Lösung I, 0,01 ml Linsenhomogenat, 0,03 ml LDH, 0,20 ml DPN. Da die Messung gegen einen Leerwert erfolgt, der die gleichen Substanzen mit Ausnahme des Linsenhomogenates enthält, ist nur eine Messung notwendig. Diese wird durchgeführt, nachdem die Cuvetten mit ihrem Inhalt genau eine Stunde bei 25° C gestanden haben.

$$\Delta E = E - E_L$$

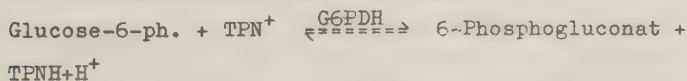
E_L = Extinktion des Leerwertes

4) Glucose-6-Phosphat, Glucose, Fruktose.

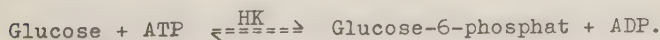
Mit dem hier beschriebenen Verfahren können Fruktose, Glucose und Glucose-6-phosphat nebeneinander bestimmt werden.

Bestimmungsprinzip:

Zunächst wird das vorhandene Glucose-6-phosphat (G-6-P) mit Glucose-6-phosphatdehydrogenase (G-6-P-DH) und TPN zu 6-Phosphogluconat und TPNH umgesetzt:



Die nun zu bestimmende Glucose wird mit ATP und Hexokinase ebenfalls in Glucose-6-phosphat überführt, welches dann nach der oben beschriebenen Reaktion bestimmt werden kann:



Nach Ablauf dieser Reaktion wird Fruktose-6-phosphat bestimmt. Fruktose-6-phosphat wird zunächst durch Zusatz

von Phosphoglucose-Isomerase (PGI) in Glucose-6-phosphat überführt.

Fruktose-6-phosphat $\xrightleftharpoons{\text{PGI}}$ Glucose-6-phosphat

Dieses wird dann ebenfalls durch die Glucose-6-phosphatdehydrogenase in 6-Phosphogluconat und $\text{TPNH} + \text{H}^+$ umgesetzt. Gemessen wird die Zunahme der TPNH-Extinktion bei 366 nm. Die Gleichgewichte der Reaktionen liegen auf der rechten Seite, die drei Reaktionen verlaufen stöchiometrisch. Das Cuvettenvolumen beträgt 3,02 ml, die Schichtdicke 20 mm.

Lösungen

- I) Triäthanolaminpuffer 0,5 m, pH = 7,6
- II) Magnesiumchlorid 0,1 m
- III) Adenosintriphosphat 0,017 m
- IV) Triphosphopyridinnucleotid 0,012 m
- V) Hexokinase (2 mg/ml)
- VI) Glucose-6-phosphatdehydrogenase (1 mg/ml)

Folgende Substanzen werden nacheinander in die Cuvette pipettiert: 1 ml enteiweißter neutralisierter Linsenextrakt, 0,10 ml MgCl_2 , 0,10 ml ATP-Lösung, 0,10 ml TPN-Lösung, 1,70 ml Puffer. Nach kräftigem Durchmischen wird E_0 nach 30 Minuten bestimmt. Danach wird zur Bestimmung des Glucose-6-phosphates 0,01 ml G-6-PDH hinzugegeben, so daß nach weiteren 30 Minuten Reaktionszeit E_1 gemessen werden kann. Nun werden 0,005 ml Hexokinase in die Cuvette gegeben, und nach weiteren 30 Min. kann E_2 abgelesen werden. Zur Bestimmung der Fruktose werden dann 0,005 ml PGI hinzugemischt, so daß E_3 eine halbe Stunde

später gemessen werden kann.

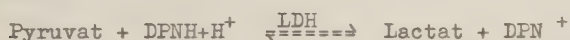
Zur Berechnung des Glucose-6-phosphates wird $\Delta E_1 = E_1 - E_0$ verwendet, Glucose wird aus $\Delta E_2 = E_2 - E_1$ ermittelt; in die Berechnung der Fruktose geht $\Delta E_3 = E_3 - E_2$ ein.

5) Brenztraubensäure, Dihydroxyacetonphosphat, Fruktose - 1,6 diphosphat.

Zur Bestimmung dieser 3 Substanzen im optischen Test dient die gleiche Indikatorreaktion, so daß für diese 3 Substrate eine in weiten Teilen einheitliche Testvorschrift gegeben werden kann.

Brenztraubensäure

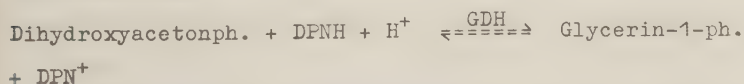
Die Lactatdehydrogenase (LDH) katalysiert die Hydrierung von Pyruvat mit reduziertem Diphosphopyridinnucleotid (DPNH)



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt weit auf der rechten Seite. Bei DPNH-Überschuß läuft die Reaktion schnell ab und überführt Pyruvat quantitativ in Lactat. Gemessen wird die Abnahme der DPNH-Extinktion.

Dihydroxyacetonphosphat

Glycerin - 1 - phosphatdehydrogenase (GDH) katalysiert die Reduktion von Dihydroxyacetonphosphat (DAP) mit reduziertem DPNH:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der rechten Seite, so daß DAP quantitativ umgesetzt wird. Gemessen wird die mit der Dehydrierung von DPNH verbundene Extink-

tionsabnahme bei 366 nm.

Fructose - 1,6 - diphosphat

Aldolase spaltet Fructose - 1,6 - diphosphat (FDP) in Glycerinaldehyd-3-ph. (GAP) und Dihydroxyacetonph. (DAP). GAP wird durch die Trioseisomerase (TIM) zu DAP isomert, DAP wird dann durch DPNH reduziert:

Fructose 1,6 diph. $\xrightleftharpoons{\text{Aldolase}}$ Glycerinaldehyd-3-ph. + DAP

Glycerinaldehyd-3-ph. $\xrightleftharpoons{\text{TIM}}$ Dihydroxyacetonphosphat

Bilanzgleichung:

$\text{FDP} + 2 \text{DPNH} + \text{H}^+ \rightleftharpoons 2 \text{Glycerin-1-ph.} + 2 \text{DPN}$

Für Mol FDP werden 2 Mol DPNH oxydiert.

Der Test wurde ohne Verwendung der TIM durchgeführt, denn sie dient lediglich zur Empfindlichkeitserhöhung des Testes.

Lösungen:

- I) Trap-EDTA-Puffer (0,5 m Triäthanolamin
0,05 m EDTA
pH = 7,6)
- II) Reduziertes Diphosphopyridinnucleotid 0,025 m
- III) Milchsäuredehydrogenase (LDH) (5 mg/ml)
- IV) Glycerin-1-phosphatdehydrogenase (GDH) (2 mg/ml)
- V) Aldolase (ALD) (10 mg/ml)

Zur Messung werden 20 mm Cuvetten verwendet. Das Gesamtcuvettenvolumen beträgt 4,05 ml.

Folgende Lösungen werden nacheinander in die Cuvette pipettiert: 2 ml Trap-EDTA-Puffer, 2 ml enteiweißter neutralisierter Extrakt, 0,02 ml DPNH. Nach einer halben Stunde Wartezeit wird E_0 gemessen. Nach der Messung wird als Ferment die (0,01 ml) LDH hinzugegeben und dann wiederum

30 Min. gewartet, bevor die zweite Extinktionsmessung erfolgt (E_1).

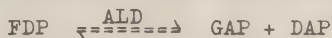
Hiernach werden 0,01 ml GDH hinzugegeben und dann nach einer weiteren Reaktionszeit von 30 Min. (E_2) bestimmt. Als letztes Ferment wird nun 0,01 ml ALD hinzugegeben, so daß (E_3) dann nach weiteren 30 Min. bestimmt werden kann.

Zur Berechnung der Brenztraubensäure wird $\Delta E_1 = E_0 - E_1$, des Dihydroxyacetonphosphates $\Delta E_2 = E_1 - E_2$ verwendet, in die Berechnung des Fruktose - 1,6 - Diphosphates geht $\Delta E_3 = E_2 - E_3$ ein.

FERMENTBESTIMMUNGEN.

6) Aldolase

Das Enzym Aldolase katalysiert die Reaktion

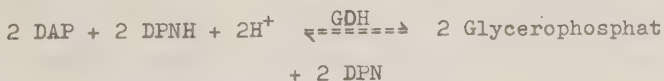


Die beiden gebildeten Triosephosphate GAP und DAP stehen miteinander im Gleichgewicht. Dieses Gleichgewicht liegt zu 96 % auf der Seite des DAP, und es stellt sich bei einem Fermentüberschuß spontan ein:

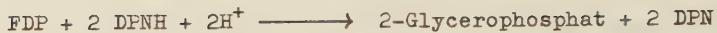


Die pro Zeiteinheit aus FDP gebildeten Triosephosphate werden zur Aktivitätsbestimmung der Aldolase herangezogen.

Zunächst wird DAP in folgender Reaktion enzymatisch (GDH) hydriert:



Die Gesamtreaktion lautet demnach also:



Der Verbrauch an DPNH ist der gespaltenen Menge an FDP proportional und kann deshalb als Meßgröße verwendet werden.

Lösungen:

- I) 2×10^{-3} m FDP-Lösung (Substrat), enthält 0,056 m an Collidin (Puffer pH 7,6 und 3×10^{-4} m Monojodacetat, um weitere Umwandlung der entstehenden Triosen zu verhindern).
- II) $1,5 \times 10^{-2}$ m DPNH Lösung in 1 % Natriumbicarbonat.
- III) Kristallsuspension der Glycerophosphatdehydrogenase und der Triosephosphat-Isomerase (TIM), diese verschiebt das Gleichgewicht von GAP auf die Seite von DAP.

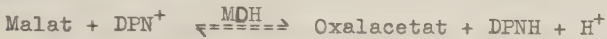
In die Cuvette werden pipettiert: 2,75 ml Lösung I, 0,04 ml Lösung II, 0,01 ml Lösung III. Anschließend 5 Minuten in thermokonstantem Wasserbad von 25° C reagieren. Spuren von DAP aus dem FDP-Präparat ab, dann werden 0,2 ml Linsenextrakt zugegeben, nach weiteren 5 Minuten wird das Reaktionsgemisch im Spektralphotometer gemessen = Extinktion bei t_0' .

20 Min. danach erfolgt die zweite Messung = Extinktion bei t_{20}' . Die Differenz ΔE geht in die Berechnung der internationalen Einheiten ein.

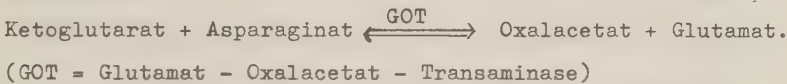
7) Malatdehydrogenase

Die Malatdehydrogenase (MDH) bewirkt die umgekehrte Dehydrogenierung von Malat zu Oxalacetat, einem wichtigen Abbauprodukt des Citronensäurecyclus. Dieses Enzym, welches

für L-Malat spezifisch ist, findet sich bei Menschen in allen Körperzellen. Die Malatdehydrogenase katalysiert folgende Reaktion:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion ist weit zugunsten von Malat verschoben. Zur Bestimmung der Aktivität des Enzyms mißt man die Rückreaktion mit Oxalacetat als Substrat und DPNH als Coenzym. Da Oxalacetat in wässriger Lösung sehr instabil ist, erzeugt man eine bestimmte Menge davon kurz vor der Aktivitätsbestimmung in der Cuvette nach folgender Gleichung:



Das hierbei entstehende Oxalacetat wird dann gemäß der ersten Gleichung umgesetzt. Die pro Zeiteinheit umgesetzte Menge Oxalacetat, gemessen an der äquivalenten Menge DPN-H, ist ein Maß für die Aktivität der Dehydrogenase.

Lösungen

- I) Phosphat/Asparaginat (0,1 Phosphatpuffer pH=7,4;
4,2 x 10⁻² m Asparaginat).
- II) Ketoglutarat (6 x 10⁻² m Lösung des Natriumsalzes).
- III) Reduz. Diphosphopyridinnucleotid (1,2 x 10⁻² m DPNH in
1 % NaHCO₃).
- IV) Glutamat - Oxalacetat - Transaminase (0,1 mg Enzym-
protein/ml).

In die Cuvette werden gegeben: 2,75 ml der Lösung I, 0,05 ml der Lösung II, 0,05 ml der Lösung III und 0,05 ml der Lösung IV. Das Gemisch bleibt zunächst 5 Min. bei 25° C

stehen. Während dieser Zeit bildet sich das Oxalacetat in ausreichender Menge. Anschließend werden 0,1 ml Linsenextrakt zugegeben. Die Differenz der Extinktionen von t_0 und $t_{20}' = \Delta E$ geht in die Berechnung ein.

8) Lactatdehydrogenase

Das Enzym Laktatdehydrogenase (LDH) katalysiert die Reaktion:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der Seite des Laktats und des DPN^+ . Zur Messung der Aktivität bestimmt man den Umsatz von Pyruvat und DPN-H pro Zeiteinheit. Hierbei dient wiederum DPN-H als Meßgröße.

Lösungen

- I) Phosphat/Pyruvat (0,05 m Phosphatpuffer pH 7,5;
 1×10^{-4} m Pyruvat).
- II) Reduziertes Diphosphopyridinnucleotid (8×10^{-3} m DPNH
in 1 % NaHCO_3 gelöst).

In die Cuvette werden gegeben: Lösung I 2,85 ml, Lösung II 0,05 ml sowie 0,1 ml des Linsenextraktes. Sofort nach Eingeben des Extraktes wird die Extinktion t_0' gemessen, nach 5 Min. der Wert t_5' . Die Differenz ΔE wird in internationale Einheiten umgerechnet.

9) Sorbitdehydrogenase

Das Enzym Sorbitdehydrogenase (SDH) katalysiert die Gleichgewichtsreaktion:



Das Gleichgewicht dieser Reaktion liegt auf der linken

Seite. Man mißt deshalb zweckmäßigerweise die Aktivität der SDH durch die Messung der zeitlichen DPN-H Abnahme.

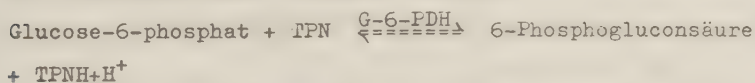
Lösungen

- I) Triäthanolaminpuffer (0,2 m, pH = 7,4).
- II) Reduz. Diphosphopyridinnucleotid ($1,5 \times 10^{-2}$ m gelöst in 1 % NaCO_3).
- III) Fruktose 3,33 m.

1,75 ml Lösung I und 0,05 ml der Lösung II, sowie 1 ml Linsenextrakt werden in die Cuvette gegeben. Das Gemisch steht anschließend eine Stunde im thermostabilen Wasserbad (25°C). Diese Zeit ist notwendig, um die Metaboliten, die im Linsenextrakt vorhanden sind, völlig abreagieren zu lassen. Dann werden 0,2 ml der Lösung III zugegeben, dadurch wird die Reaktion ausgelöst. Die Extinktionsdifferenz ΔE aus t_0 und t_{20} geht in die Berechnung ein.

10) Glucose-6-Phosphatdehydrogenase

Die Glucose-6-Phosphatdehydrogenase (G-6-PDH) katalysiert als Zwischenferment folgende Reaktion:



Das Gleichgewicht liegt auf der Seite der 6-Phosphogluconsäure und des TPNH. Gemessen wird bei dieser Reaktion der zeitliche Umsatz von Glucose-6-Phosphat und TPN. Hierbei dient TPNH als Meßgröße.

Lösungen

- I) Triäthanolaminpuffer (5×10^{-2} m; pH = 7,6;
 5×10^{-3} m EDTA)

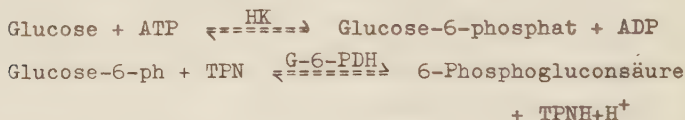
II) Triphosphopyridinnucleotid ($1,0 \times 10^{-2}$ m)

III) Glucose-6-phosphat (G-6-P-Na, $4,1 \times 10^{-2}$ m)

Obenstehende Lösungen werden nacheinander in die Cuvette pipettiert. 1,85 ml der Lösung I, 0,1 ml der Lösung II und 1 ml Linsenextrakt. Das Gemisch bleibt 5 Min. bei 25 stehen. Dann werden 0,05 ml der Lösung III hinzugegeben. Sofort und nach 5 Min. wird die Extinktion gemessen. Die Differenz ΔE geht in die Berechnung ein.

11) Hexokinase (HK)

Die Hexokinase katalysiert folgende Reaktion:



Das in der nachgeschalteten Hilfsreaktion entstehende $\text{TPNH} + \text{H}^+$ ermöglicht die Bestimmung und dient als Meßgröße

Lösungen

I) Triäthanolaminpuffer (0,05 m, pH 7,6).

II) 10 % Glucose in Triäthanolaminpuffer.

III) Magnesiumchloridlösung (0,1 m)

IV) Adenosintriphosphat (10 mg/ml)

V) Triphosphopyridinnucleotid

VI) Glucose-6-phosphat - Dehydrogenase (0,2 mg/ml)

Es werden nacheinander in die Cuvette gegeben: 1,30 ml der Lösung I, 20 ml der Lösung II, 0,02 ml der Lösung III, 0,1 ml der Lösung IV, 0,2 ml der Lösung V, 0,01 ml der Lösung VI sowie 0,04 ml Linsenextrakt. Nach einer Minute wird dann die Extinktion gemessen und als E_{t_0} eingesetzt

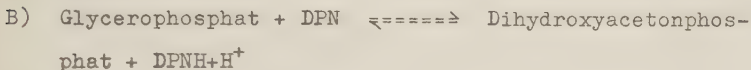
der zweite Wert wird nach 20 Minuten abgelesen (t_{20}). Die Differenz ΔE geht in die Berechnung ein.

12) Glycerokinase (GK)

Die Aktivität der Glycerokinase wird in einem zusammengesetzten optischen Test gemessen. Die Glycerokinase selbst katalysiert folgende Reaktion:



Als Indikatorreaktion für diese Bestimmung dient die Reaktion:



Hierbei dient DPNH als Meßgröße.

Lösungen

- I) Hydrazinpuffer (pH 9,8).
- II) ATP (50 mg/ml aqua bidest)
- III) DPN (15 mg/lm aqua bidest)
- IV) Glycerophosphatdehydrogenase (10 mg/ml)
- V) Glycerin (1/10 m)

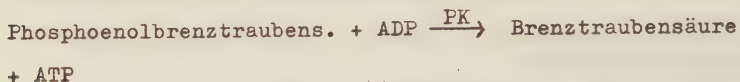
Es werden nacheinander in die Cuvette gegeben:

1,80 ml der Lösung I, 0,03 ml der Lösung II, 0,05 ml der Lösung III, 0,02 ml der Lösung IV, 0,05 ml der Lösung V und 0,01 ml Linsenextrakt. Nach einer Inkubationszeit von 2 Minuten bei 25°C wird die Extinktion bei 0 und 10 Min. bestimmt. Die Differenz ΔE geht in die Berechnung ein.

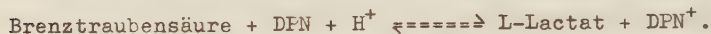
13) Pyruvatkinase (PK)

Die Pyruvatkinase ist ein transphosphorylierendes Enzym.

Es katalysiert die Phosphatübertragung der Phosphoenolbrenztraubensäure auf Adenosindiphosphat:



Das Gleichgewicht liegt weit zugunsten der ATP-Bildung. Die Messung der Aktivität erfolgt deshalb indirekt über eine zweite Reaktion:



Die Abnahme der DPNH-Extinktion dient als Meßgröße.

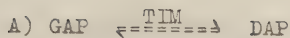
Lösungen

- I) Triäthanolpuffer (pH 7,6 0,05 m)
- II) MgSO_4 (0,5 m in KCl 2 m)
- III.) Phosphoenolpyruvat (5 mg PEP, Tricyclohexylammoniumsalz)
- IV) ADP (10 mg/ml)
- V) DPNH (10 mg/ml)
- VI) LDH (5 mg/ml, PK frei)

In die Cuvette werden gegeben: 2,46 ml der Lösung I, 0,15 ml der Lösung II, 0,10 ml der Lösung III, 0,2 ml der Lösung IV, 0,05 ml der Lösung V und 0,02 ml der Lösung VI. Das Gemisch wird zunächst etwa 3 Min. bei 25° C stehen gelassen, dann wird 0,01 ml Linsenextrakt hinzugegeben. Die Extinktion wird sofort und nach 5 Minuten gemessen. Die Differenz ΔE geht in die Berechnung ein.

14) Trioseisomerase

Die Aktivität der Trioseisomerase wird im zusammengesetzten optischen Test nach folgenden Gleichungen gemessen:



Diese Reaktion wird durch das Enzym TIM katalysiert.

(GAP = Glycerinaldehyd-3-phosphat;

DAP = Dihydroxyacetonphosphat)

Als Meßgröße dient nach folgender Reaktion wiederum die DPN-H-Extinktion.



(GDH = Glycerindehydrogenase;

GP = Glycerinphosphat)

Lösungen

I) Triäthanolaminpuffer (M/20 : pH = 7,6)

II) Triosephosphat-Ester-Lösung

(TPE "BOEHRINGER" neutralisiert auf pH 7,0)

III) DPN-H (10 mg/ml)

IV) GDH (10 mg/ml)

In die Cuvette werden nacheinander pipettiert:

2,70 ml Lösung I, 0,10 ml der Lösung II, 0,15 ml der Lösung III und 0,01 ml der Lösung IV.

Zunächst reagiert durch die Zugabe von GDH alles DAP aus der TPE-Lösung ab. Erst, wenn der Test völlig zum Stillstand gekommen ist, werden mit dem abgeflachten Kunststoffspatel 0,02 ml Linsenextrakt hinzugegeben. Die Extinktionsdifferenz ΔE , die für die Berechnung der I.E. notwendig ist, ergibt sich aus den beiden Extinktionsmessungen bei t_0' und t_5' .

Umrechnung der gemessenen Extinktionen in Fermentaktivitäten (bei den Fermenten) bzw. in Millimol/100 g Linsengewicht (bei den Substraten).

Die Umrechnung der gemessenen Extinktionen bei der Bestimmung der energiereichen Adenosinnucleotide und der Glykolysezwischenprodukte in Mol/100 g Linsengewicht erfolgte nach folgender Formel:

$$\text{Mol/100 g} = \frac{E \times \text{GKV} \times \text{GV}}{\text{Sd} \times K \times \text{eingesetzte Extraktmenge} \times \text{LG}}$$

E = gemessene Extinktionsdifferenz

GKV = Gesamtcuvettenvolumen

GV = Das Volumen des für jede Linse gleichartig aufgefüllten Linsenextraktes.

Sd = Schichtdicke

K = millimolarer Extinktionskoeffizient (3,3) für DPN-H bzw. TPN
- H

LG = Linsengewicht

Berechnung der Fermentaktivitäten

Die Berechnung der Fermentaktivitäts-Einheiten erfolgt nach der unten für jedes Ferment angegebenen Formel. Die Einheiten der Dehydrogenasen und der Aldolase werden in internationale Milli-Einheiten pro Gramm Frischgewicht umgerechnet. Die Kinasen werden durch den zeitlichen Umsatz an Mikromol DPN (TPN) pro Gramm Gewebe ausgedrückt.

1.) ALD : $\Delta E \times 114,3 \times 50 = \text{milli E/1g Linse}$

- 2.) MDH : $\Delta E \times 9110 \times 50 = \text{milli E/1 g Linse}$
- 3.) SDH : $\Delta E \times 91 \times 50 = \text{milli E/1 g Linse}$
- 4.) LDH : $\Delta E \times 9100 \times 50 = \text{milli E/1 g Linse}$
- 5.) G-6-PDH : $\Delta E \times 910 \times 50 = \text{milli E/1 g Linse}$
- 6.) HK : $\Delta E \times (0,001) \times 1,125 = \mu\text{M DPN/1 g / } 20'$
- 7.) GK : $\Delta E \times (0,001) \times 4,5 = \mu\text{M DPN/1 g / } 10'$
- 8.) FK : $\Delta E \times (0,0001) \times 0,45 = \mu\text{M DPN/1 g / } 5'$
- 9.) TIM : $\Delta E / 1' \times (0,001) \times 0,225 = \mu\text{Mol DPN/1g/t}$

Die milli-Einheiten der ALD, LDH und TIM müssen mit dem Faktor 5 multipliziert werden, da vor der Bestimmung ihrer Aktivitäten das Dekantat mit Aqua bid. im Verhältnis 1 : 5 verdünnt worden ist. Die errechneten Einheiten finden sich in den Tabellen (7) und (9).

V. Ergebnisse

Da wir bei unseren Versuchen immer nur eine Linse der Paare der p - Hydroxyphenylbutazonbeeinflussung aussetzten, die jeweiligen Geschwisterlinsen dagegen unbeeinflusst in normaler TC 199 - Lösung kultiviert wurden, können nun die Werte zwischen unbeeinflussten und beeinflussten Linsen verglichen werden. Wenn möglich, wurde eine Altersklassifizierung der Linsen nach Gewicht vorgenommen. Linsen, deren Gewicht 1,3 g nicht überschritt, zählten wir zu den Kälberlinsen, die Linsen, die schwerer als 1,3 g waren, zu den Rinderlinsen. Lediglich bei der Bestimmung der Glykolysezwischenprodukte und der energiereichen Adenosinnucleotide bei der 10^{-2} m Tanderilbeeinflussung wurde eine dreistufige Alterseinteilung nach Linsengewicht vorgenommen ($< 1,3$ g; $1,3$ g bis $2,0$ g; $> 2,0$ g). Die Fermentaktivitäten der 4 Dehydrogenasen (MDH, LDH, SDH und G-6-PDH), der Aldolase, der 3 Kinasen (PK, GK, HK) und der Trioseisomerase wurden bei der 10^{-2} m Tanderilbeeinflussung an 8 Paar Kälbern und 6 Paar Rinderlinsen, bei der 10^{-4} m Beeinflussung an 2 Paar Kälber- und 2 Paar Rinderlinsen bestimmt. Die Bestimmung der Glykolysezwischenprodukte wurde bei der 10^{-2} m Konzentration an 17 Paaren, die der energiereichen Adenosinnucleotide an 10 Paaren vorgenommen. Bei der 10^{-4} m Konzentration (OFB) ermittelten wir bei 9 Linsenpaaren die Glykolysezwischenprodukte und bei 14 Paaren die energiereichen Adenosinnucleotide.

Die genaue Zahl der untersuchten Linsen ist aus der folgenden TABELLE 1 zu ersehen:

10^{-4} m OPB-Konzentration

	Anzahl der Linsen ohne OPB-Beeinflussung	Anzahl der Linsen unter 10^{-4} m OPB-Beeinflussung	Paare
Fermente	4	4	4
Glykolyse-Zwischenprodukte	9 (Milchsäure 15)	10 (Milchsäure 16)	9 (Milchsäure 15)
energie-reiche Adenosin-nucleotide	14 (AMP 13)	15 (AMP 13)	14 (AMP 13)

10^{-2} m OPB-Konzentration

	Anzahl der Linsen ohne OPB-Beeinflussung	Anzahl der Linsen unter 10^{-2} m OPB-Beeinflussung	Paare
Fermente	14	14	14
Glykolyse-zwischenprodukte	17	17 (Milchsäure 16)	17 (Milchsäure 16)
energie-reiche Adenosin-nucleotide	10	17	10

Glykolysezwischenprodukte und Adenosinnucleotide bei der
 10^{-4} m Tanderilbeeinflussung.

Unsere Ergebnisse bei der Kultivierung von jungen und alten Linsen in TC 199 verglichen mit den jeweiligen Geschwisterlinsen, die in TC 199 unter OPB-Zusatz (10^{-4} m) inkubiert wurden, sind aus Tabelle 3 zu entnehmen. Die Linsen waren bei dieser OPB-Konzentration nach der 24 Stunden Kultivierung nicht getrübt und zeigten ebenso wie die unbeeinflussten Linsen eine geringe Gewichtszunahme. Bei Betrachtung der Tabellen 3 und 5 und der Darstellungen II, III und IV fällt auf, daß bei dieser OPB-Konzentration keine wesentliche Beeinflussung des Linsenstoffwechsels stattfindet. ATP und ADP erscheinen in den beeinflussten Kälber- und Rinderlinsen ein wenig vermehrt, jedoch bei Vergleich der Werte der einzelnen Linsenpaare zeigt sich, daß ATP in fünf Fällen in den beeinflussten Linsen vermehrt, in vier Fällen vermindert und in fünf Fällen gleich geblieben ist, so daß man hier also kaum von einer Beeinflussung (+ 11,8 %) sprechen kann. Betrachtet man Tabelle 5, so sieht man, daß die ATP-Zunahme vorwiegend in den beeinflussten Kälberlinsen stattfindet (+ 20,1 %). In den Rinderlinsen dagegen beträgt sie nur (+11,4 %). Beim ADP erhält man (+9,9 %) ein ähnliches Ergebniss (6+, 4-, 4=). AMP scheint ein wenig vermindert zu sein (-18,2%), vier Werte der beeinflussten Linse liegen niedriger als bei der nicht beeinflussten Geschwisterlinse, ein Wert höher, sieben sind gleichgeblieben. Von den untersuchten Glykolysezwischenprodukten ist lediglich die Glucose in den beeinflussten Linsen (+14,0 %) etwas vermehrt

(4+, 1-, 4=). Betrachtet man jedoch Kälber- und Rinderlinsen getrennt (Tab. 5), so erkennt man, daß die Glucosezunahme bei den Rinderlinsen signifikant ist (47,7%), während sie bei den Kälberlinsen nur 10,1% beträgt. Das Dihydroxyacetonphosphat dagegen hat geringfügig abgenommen. (2+, 5-, 2=).

Milchsäure, Glucose-6-Phosphat, Brenztraubensäure, Fruktose, Fruktose-1,6-diphosphat zeigen bei dieser 10^{-4}m OPB-Beeinflussung keine Veränderungen. Jedoch auch die anderen genannten Abweichungen bei den Adenosinnucleotiden, der Glucose und dem Dihydroxyacetonphosphat sind so geringfügig, daß man von einer sicheren Beeinflussung des Linsenstoffwechsels bei dieser OPB-Konzentration nicht sprechen kann.

Fermentaktivitäten bei der 10^{-4}m OPB-Konzentration nach 24-stündiger Kultivierungsdauer.

Da die vorangegangenen Substratbestimmungen keine wesentlichen Veränderungen aufzeigten, wurden die Fermentbestimmungen bei dieser OPB-Konzentration nur an insgesamt 4 Paar Linsen (2 Paar Kälber- und 2 Paar Rinderlinsen) durchgeführt. Wie aus Tabelle 9 zu ersehen ist, treten bei den Fermenten keine signifikanten Differenzen zwischen unbeeinflussten und beeinflussten Linsen auf.

Zum besseren Verständnis soll in diesem Zusammenhang noch auf die quantitative Verteilung der Fermente in Kälber- und Rinderlinsen hingewiesen werden. Betrachtet man auf Tabelle 7 und 9 lediglich einmal die Fermentaktivitäten

der unbeeinflussten Linsen, so fällt auf (wie auch aus anderen Untersuchungen bekannt ist), daß die LDH und die MDH sowohl in jungen als auch in alten Linsen die bei weitem größte Aktivität zeigen. Daraus kann man nun schließen, daß diese beiden Fermente in hohem Überschuß in der Linse vorhanden sein müssen und somit wohl kaum Anlaß zu Störungen im Stoffwechsel bei geringfügigen Veränderungen geben würden. Auch wenn man berücksichtigt, daß die Aktivitätsbestimmungen im Homogenat stets unter optimalen Bedingungen erfolgen, (die Verhältnisse in vivo liegen sicherlich anders), so dürfte wohl bei diesen beiden Fermenten die auch in vivo vorhandene große Reserve eine Änderung des Stoffwechsel durch OPB verhindern. Wie später noch im einzelnen erläutert werden soll, zeigte sich bei diesen Fermenten auch bei einem 10^{-2} m OPB-Zusatz zur Nährlösung keine Änderung der Aktivitäten.

Betrachtet man nun die Fermentaktivitäten der Aldolase, der DPN-abhängigen Sorbitdehydrogenase und der Glucose-6-phosphatdehydrogenase, so fällt auf, daß diese weit niedriger liegen als die der LDH und MDH, jedoch etwa in den gleichen Größenordnungen vorkommen. Auch bei diesen Fermenten kann man annehmen, daß sie in vivo nicht voll beansprucht werden, sondern stets eine gewisse Reserve für erhöhte Beanspruchung aufweisen (KLEIFELD und Mitarbeiter wiesen z. B. für die Aldolase im Linsenhomogenat nach, daß sie bei erhöhtem Fruktose-1,6-diphosphatangebot dieses Substrat vermehrt spaltet, und somit durch die erhöhte Triosephosphateinschleusung in den Stoffwechsel eine ver-

mehrte Bildung der energiereichen Adenosinnucleotide resultiert).

Bei den nun zu beschreibenden Kinasen fällt vor allem die geringe Aktivität der Pyruvatkinase ins Auge. Die PK, die als transphosphorylierendes Ferment den Phosphatrest der Phosphoenolbrenztraubensäure auf ADP überträgt, kann bei einer Beeinflussung auf Grund der geringen Aktivität leicht zu einem Stoffwechselengpaß Anlaß geben.

Eine geringfügige Abnahme der Pyruvatkinasenaktivität in der alternden Linse, wie sie von MÜLLER und Mitarbeitern nachgewiesen worden ist, läßt sich auch bei unseren Ergebnissen erkennen, wenn man die Werte der PK bei Kälber- und Rinderlinsen, die ohne OPB-Zusatz inkubiert wurden, miteinander vergleicht (Tab. 7 und 9). Die durch diese Abnahme bedingte Abbaubehinderung muß demnach zu einer Vermehrung der Phosphoenolbrenztraubensäure in der alternden Linse führen. Eine geringe Abnahme der Pyruvatkinase ist bei unseren Versuchen sowohl bei der 10^{-2} m als auch bei der 10^{-4} m OPB-Beeinflussung bei Kälber- und Rinderlinsen erkennbar. Vergleicht man in Tabelle 7 Rinder- und Kälberlinsen miteinander, um eine Altersabhängigkeit der Fermentaktivitäten festzustellen, so läßt sich erkennen, daß eine solche bei den drei genannten Kinasen kaum registrierbar ist, bei der oben genannten MDH und der LDH dagegen eine starke Abnahme der Aktivität mit dem Älterwerden der Linse stattfindet. Vor allem die LDH ist prozentual am stärksten betroffen (Kälberlinsen - LDH = 11907 mE / g/t, Rinderlinsen - LDH = 6792 mE / g / t). Umgekehrt verhält

sich die SDH (in Kälberlinsen = $165,1 \mu\text{M DPN/g/t} \times 10^{-3}$, in Rinderlinsen $201,2 \mu\text{M DPN / g / t} \times 10^{-3}$), die in Rinderlinsen höhere Werte zeigt als in Kälberlinsen. Die SDH-Zunahme in der alternden Linse bedingt eventuell eine Bevorzugung des Sorbitolweges beim Kohlenhydratabbau im höheren Alter.

Glykolysezwischenprodukte und Adenosinnucleotide bei der 10^{-2} m OPB-Konzentration.

Ganz anders als bei der 10^{-4} m OPB-Konzentration verhält sich der Linsenstoffwechsel, wenn er während der 24-stündigen Kultivierung höheren OPB-Konzentrationen ausgesetzt wird. Bei der 10^{-2} m OPB-Konzentration findet eine wesentliche Änderung des Substratgehaltes und auch einiger Fermentaktivitäten in den Linsen statt. Betrachtet man zunächst die Gesamtübersicht (Tab. 4 und Abb. II - IV), so fällt besonders eine starke Abnahme des ATP in der beeinflussten Linse auf. In allen 10 verglichenen Linsenpaaren hat der ATP-Gehalt wesentlich unter OPB abgenommen. Setzt man den unbeeinflussten Wert gleich 100 %, so beträgt die ATP-Abnahme der beeinflussten Linse 76 %. Ein ähnliches Bild ergeben die ADP-Werte. Insgesamt ist hier eine Abnahme von 34 % zu verzeichnen. AMP dagegen hat unter der OPB Beeinflussung in allen Fällen zugenommen. In Prozenten ausgedrückt beträgt hier die Zunahme 24 %. Verfolgt man nun die Glykolysezwischenprodukte, so scheinen lediglich die Milchsäure, die Brenztraubensäure und das Dihydroxyacetonphosphat (+14,6%) unverändert geblieben zu sein, während Glucose-6-phosphat (-77,9 %), Glucose

(-34,4 %) und Fruktose (-61,0 %) in den beeinflussten Linsen stark abgenommen haben, hingegen bei Fruktose-1,6-diphosphat eine Zunahme erkennbar ist (+44,4 %). Untergliedert man nun die Linsen nach Gewicht in 3 Klassen (-1,3 g; 1,3 g - 2,0 g; >2,0 g), so bekommt man eine grobe Alters-einteilung. Die Beeinflussung des Linsenstoffwechsels in diesen verschiedenen Altersklassen durch das Tanderil (10^{-2} m) ist aus Tabelle 6 und den Abbildungen V - IX zu entnehmen.

Der ATP-Gehalt wird bei Kälber- und Rinderlinsen gleichermaßen stark herabgesetzt. Die Abnahme beträgt 70 bis 80%. Beim ADP dagegen lassen sich einige altersbedingte Beeinflussungsunterschiede feststellen. In den Kälberlinsen (- 1,3 g) erfolgt in allen vier verglichenen Linsenpaaren eine signifikante Abnahme (-41,8 %), die schon in der mittleren Altersklasse (1,3 g - 2,0 g) nicht mehr so deutlich ausgeprägt ist (2-; 2=) (-36,4%) und schließlich bei den Rinderlinsen ganz fehlt (Abb. V). Hier erfolgt zumindest im ADP-Bereich bei Linsen über 2,0 g keine Beeinflussung mehr (-1,3 %).

Der AMP-Gehalt dagegen nimmt in allen Gewichtsklassen zu (der Abnahme des ATP entsprechend), so daß hier keine Altersabhängigkeit zu verzeichnen ist (Abb. VI). Die Zunahme beträgt im Mittel 24 %. Sie ist bei den Linsen mit mehr als 2,0 g Gewicht am größten und beträgt dort 44 %.

Milchsäure, Brenztraubensäure und Dihydroxyacetonphosphat, die bei der Gesamtbetrachtung (Tab. 4) unverändert erschienen, zeigen auch bei der Aufgliederung in die drei

Altersstufen keine signifikanten Differenzen. Lediglich das Dihydroxyacetonphosphat ist in den Kälberlinsen durch OFB etwas angereichert (+23 %).

Signifikante Differenzen dagegen sind in allen Altersklassen bei der Glucose und dem Glucose-6-phosphat zu verzeichnen. In allen Altersklassen ist hier eine Abnahme durch Tanderilbeeinflussung zu erkennen (Abb. VII). Die Verminderung der Glucose (-40,1%) ist bei den Kälberlinsen am deutlichsten, während die Rinderlinsen unempfindlicher zu sein scheinen (-13,4 %).

Ähnlich verhält sich die Fruktose (Abb. VIII), die unter der Beeinflussung bei den Kälberlinsen am stärksten (-83,6 %), bei den älteren Linsen bedeutend weniger abnimmt (-27,5 %). Fruktose-1,6-diphosphat verhält sich umgekehrt (Abb. IX). Hier kommt es zu einer Zunahme unter OFB Beeinflussung, die bei den Kälberlinsen (+44,3 %) und bei den Rinderlinsen (+40,0 %) deutlich ausgeprägt ist.

Fermentaktivitäten bei der 10^{-2} m OFB-Beeinflussung nach 24 stündiger Kultivierungsdauer (Tab. 7 und Abb. X - XIII)

Bei dieser OFB-Konzentration wurden 8 Paar Kälber- und 6 Paar Rinderlinsen der Beeinflussung ausgesetzt. Aus der Tab. 7 geht hervor, daß bei den Kälberlinsen trotz Beeinflussung keine wesentliche Aktivitätsänderungen bei der ALD, LDH, TIM (-5,8 %), MDH (+5,4 %), SDH (-7,4 %), HK und GK stattgefunden haben, während die Aktivitäten der G-6-PDH (-24,2 %) und der PK (-13,7 %) abgenommen haben. Von den beiden zuletzt genannten Fermenten zeigt die G-6-PDH auch bei den Rinderlinsen unter der OFB Beeinflussung eine Ak-

tivitätsabnahme (-31,6 %), während die PK bei diesen Linsen weniger Aktivität verliert (-5,8 %). Bei den Rindern wäre weiterhin noch eine Zunahme der Fermentaktivitäten bei der ALD (+18,2 %) und bei der TIM (+21,5 %) zu verzeichnen, während die Aktivitäten der anderen Fermente (s.o.) nur geringfügig verändert sind.

VI. DISKUSSION

Wie wir gesehen haben, findet bei der 10^{-4} m Tanderil Beeinflussung der Linsen keine wesentliche Konzentrations- bzw. Aktivitätsbeeinflussung statt.

Um nun die bei der 10^{-2} m OPB Konzentration aufgetretenen Änderungen des Substratgehaltes und auch einiger Fermentaktivitäten erklären zu können, habe ich versucht, die ermittelten Substrate und Fermente in das Stoffwechselschema zu bringen. Setzt man nun, unabhängig vom Alter der Linsen, die Substratmengen und Fermentaktivitäten der unbeeinflussten Linsen gleich 100 %, so kann man die Zu- oder Abnahme der Substrate und Fermentaktivitäten prozentual ausdrücken. Das ist hier geschehen (Stoffwechselschema Abb. I und Tabelle 4 und 8).

Betrachtet man zunächst einmal die energiereichen Adenosinnucleotide, so fällt sofort die vorhin schon beschriebene Abnahme des ATP um 76 % auf. Die Bildung des ATP im Stoffwechsel erfolgt

1. in der Atmungskette in Form der oxydativen Phosphorylierung. Hier wird der größte Teil der Energie freigesetzt, die zu 40 % in Form des ATP gespeichert wird;
2. in der Substratkettenphosphorylierung, also beim Abbau der Glucose bis zur Brenztraubensäure.

Der überwiegende Teil der Energielieferung erfolgt in der Atmungskette. Pro Mol Glucose entstehen hier aus ADP 30 Mol ATP, während in der Glykolysekette pro Mol Glucose nur 4 ATP gebildet werden.

Da nun bei unseren Versuchen das ATP um 76 % abgenommen hat, müßte demnach das Tanderil also entweder innerhalb der Glykolysekette den normalen Ablaufweg blockieren (das würde zu einer Abnahme der Substratkettenphosphorylierung und einem verminderten Einschleusen von Brenztraubensäure und Acetyl-CoA in den Zitronensäurecyclus führen und somit gleichzeitig einen Leerlauf der Atmungskette bewirken), oder die andere Möglichkeit besteht darin, daß es direkt in der Atmungskette angreift und dort eine Entkopplung der oxydativen Phosphorylierung hervorruft.

Schwieriger zu erklären ist die Abnahme des ADP um 34 % ($2 \text{ ADP} \longleftrightarrow \text{ATP} + \text{AMP}$). Normalerweise müßte dieses ja durch die verminderte Umwandlung zu ATP vermehrt sein, oder das AMP müßte zumindest wesentlich mehr zunehmen.

Diese Diskrepanz mag vielleicht darin begründet liegen, daß noch energieliefernde Prozesse in der Linse ablaufen, die auf Grund des nicht vorhandenen ATP einen Abbau des ADP zu AMP bewirken. AMP wiederum kann ebenfalls weiter abgebaut werden, und zwar kann das Adenosin nach Abspaltung der Phosphorsäure über Inosit, Hypoxanthin und Xanthin in Harnsäure umgewandelt worden sein. Eine zweite Erklärung bietet die Annahme einer vermehrten Kopplung der ADP-Moleküle zu ATP und AMP ($2\text{ADP} \longrightarrow \text{ATP und AMP}$). Betrachtet man nun die Substrate, so muß man daran denken, daß ihre Konzentration in der Linse

1. vom Transport aus der Nährlösung in die Linse und
2. vom Stoffwechselgeschehen innerhalb der Linse beeinflusst wird.

Von der Glucose, die in unserem Fall in den durch Tanderil beeinflussten Linsen um 34,4 % abgenommen hat, ist bekannt, daß sie nur im phosphorylierten Zustand aus der Nährlösung in die Linse übergehen kann. Da die Phosphorylierungsprozesse aber durch die verminderte ATP-Bildung in der Linse gestört sind, ist die Abnahme der Glucose und entsprechend die auf dem gleichen Mechanismus beruhende Abnahme der Fruktose um 61 % verständlich. Das Absinken der energiereichen Verbindungen und die Störungen im Kohlenhydratstoffwechsel lassen sich weiterhin durch die verminderte Phosphataufnahme in die Linse erklären. HOCKWIN konnte nachweisen, daß der Zusatz von OPB (10^{-2} m) zur Nährlösung die ^{32}P -Aufnahme in die Linse recht erheblich einschränkt. Bei einer Inkubationszeit von 2 Stunden wird von der OPB-beeinflußten Linse nur ein Viertel des Wertes der unbeeinflussten Linse erreicht. Der aktive Transportvorgang von ^{32}P aus der Nährlösung in die Linse ist also durch OPB gestört. (Symp.-Report: The Importance and treatment of inflammation in ophthalmology 1966).

Diese Abnahme der Glucose muß selbstverständlich trotz intakter Hexokinase zu einer Verminderung des Glucose-6-phosphates führen, die bei uns 77,9 % betrug. Glucose-6-phosphat hat also noch wesentlich mehr abgenommen als die Glucose. Das ist nur in einem verstärkten Abbau des Glucose-6-phosphates unter Tanderilbeeinflussung zu deuten. Als nächstes fällt der relativ starke Anstieg des Fruktose-1,6-diphosphates auf, welcher in den beeinflussten

Linsen 44,4 % betrug. Diese Zunahme kann erklärt werden

- 1.) durch den vermehrten Abbau des Glucose-6-phosphates,
- 2.) durch einen Block in der Glykolysekette unterhalb des Fruktose-1,6-diphosphates.

Dieser Block ist eventuell durch die Abnahme der PYRUVAT-KINASE um 15,8 % zu erklären. Da die Pyruvatkinaseaktivität in den Linsen ja sehr gering ist, kann eine Verringerung um 15,8 % vielleicht dieses Anhäufen des Fruktose-1,6-diphosphates bewirken. Damit wäre dann auch die Abnahme des ATP um 76 % durch eine nicht mehr normal stattfindende Atmungs- und Substratkettenphosphorylierung erklärbar. Ebenso ist dann die Zunahme des DIHYDROXYACETON-PHOSPHATES um 14,6 % zu deuten.

Betrachtet man nun die geschilderten Ergebnisse zusammenfassend, so kann man sagen, daß Tanderil

1. in der Lage ist, den Stoffwechsel der Linse zu beeinflussen. Dabei muß v. a. die ATP-Abnahme beachtet werden, die sicherlich eine Störung endergonischer Prozesse nach sich zieht;
2. gleichzeitig z.T. die anfangs geforderten anti-entzündlich wirkenden Eigenschaften als Therapeutikum erfüllt, indem es die Glykolyse hemmt.

Man muß nun bei diesen Ergebnissen stets daran denken, daß hier die Fermente und Substrate unter optimalen Bedingungen bestimmt worden sind und damit nicht ein exaktes Bild über die wirkliche Stoffwechseländerung *in situ* widerspiegeln. Weiterhin ist zu berücksichtigen, daß hier ein normaler Stoffwechsel in gesundem und nicht

entzündlich verändertem Gewebe der Tanderilbeeinflussung ausgesetzt worden ist.

VII. ZUSAMMENFASSUNG

Aus der Problemstellung geht hervor, daß die Kenntnis der Stoffwechselvorgänge in der Augenlinse unter Beeinflussung verschiedener Therapeutika für die Kataraktentstehung von großer Bedeutung ist.

Untersucht wurde in dieser Arbeit das Verhalten der Fermentaktivitäten (Malatdehydrogenase, Laktatdehydrogenase, Sorbitdehydrogenase, Glucose-6-phosphatdehydrogenase, Aldolase, Hexokinase, Glycerokinase, Pyruvatkinase, Trioseisomerase), der Glykolysezwischenprodukte (Milchsäure, Glucose-6-phosphat, Glucose, Fruktose, Fruktose-1,6-diphosphat, Brenztraubensäure und Dihydroxyacetonphosphat) und der Adenosinnucleotide (ATP, ADP, AMP) in Kälber- und Rinderlinsen unter der Beeinflussung durch Oxyphenylbutazon (Tanderil), dessen Pharmakologie, Stoffwechsel und Bedeutung für die Augenheilkunde im Literaturteil kurz dargestellt worden ist. Nach der Erläuterung des Linsenstoffwechsels und der allgemeinen biochemischen Veränderungen im Stoffwechsel beim Entzündungsvorgang werden im experimentellen Teil Untersuchungsmaterial und -methoden eingehend besprochen.

Bei den durchgeführten Untersuchungen finden sich folgende Ergebnisse:

1.) Bei der 24-stündigen Kultivierung der Linsen unter

der 10^{-4} m Tanderilbeeinflussung zeigten sich in den beeinflussten Linsen weder in der Konzentration der Glykolysezwischenprodukte noch in den Fermentaktivitäten signifikante Unterschiede von den unbeeinflussten Geschwisterlinsen. Lediglich die energiereichen Adenosinnucleotide zeigten in den beeinflussten Linsen geringfügige Veränderungen.

2.) Bei der 24-stündigen Kultivierung der Linsen unter der 10^{-2} m OPB-Beeinflussung dagegen findet eine wesentliche Änderung des Substratgehaltes, der energiereichen Adenosinnucleotide und auch einiger Fermentaktivitäten in den beeinflussten Linsen statt. ATP und ADP verringern sich unter Tanderileinwirkung wesentlich, AMP nimmt zu. Von den Glykolysezwischenprodukten haben in den beeinflussten Linsen Glucose, Glucose-6-phosphat und Fruktose stark abgenommen, dagegen ist bei Fruktose-1,6-diphosphat eine signifikante Zunahme erkennbar. Die Veränderungen sind in den Kälberlinsen am deutlichsten ausgeprägt.

Bei den Fermentaktivitäten zeigt sich eine deutliche Abnahme der G-6-PDH und der PK, während die Fermentaktivitäten der ALD und TIM in den beeinflussten Linsen zugenommen haben.

TABELLE 2
TC 199-Lösung

	Mg pro 1000 ml		Mg pro 1000 ml
L Argimin	70,0	Thiamin	0,010
L Histidin	20,0	Riboflavin	0,010
L Lysin	70,0	Pyridoxin	0,025
L Tyrosin	40,0	Pyridoxal	0,025
DL Tryptophan	20,0	Niacin	0,025
DL Phenylalanin	50,0	Nicacinamid	0,025
L Cystin	20,0	Pantothenat	0,010
DL Methionin	30,0	Biotin	0,010
DL Serin	50,0	Folinsäure	0,010
DL Threonin	60,0	Cholin	0,500
DL Leucin	120,0	Inositol	0,050
DL Isoleucin	40,0	p-Aminobenzoesäure	0,050
DL Valin	50,0	Vitamin A	0,10
DL Glutaminsäure	150,0	Calciferol (Vit D)	0,10
DL Asparaginsäure	60,0	Menadion (Vit.K)	0,01
DL Alanin	50,0	-Tocopherolphosphat (Vit. E)	0,01
L Prolin	40,0	Ascorbinsäure (Vit. C)	0,05
L Hydroxyprolin	10,0	Glutathion	0,05
Glycin	50,0	Tween 80	20,00
Cystein	0,1	Cholesterol	0,20
Adenin	10,0	Natriumacetat	50,0
Guanin	0,3	L.Glutamin	100,0
Xanthin	0,3	Adenosintriphosphat	10,0
Hypoxanthin	0,3	Adenylsäure	0,2
Thymin	0,3	Ferri-nitrat	0,1
Uracil	0,3	Ribose	0,5
		Desoxyribose	0,5

TABELLE 3

Mittelwerte der Glykolysezwischenprodukte sämtlicher Linsen ohne Berücksichtigung der Linsengewichte bei der 10^{-4} m OPB-Beeinflussung ($\frac{\mu\text{Mol}}{100 \text{ g}}$)

OPB	ATP	ADP	AMP	Milch-säure	G-6-Ph.	Glucose	Frukto-se	BTS	Dihydroxyace-tonph.	Fructose-1,6-diph.
0	14 89,8	14 43,2	13 42,4	15 647	9 5,15	9 13,93	9 28,75	9 27,5	9 3,22	9 1,93
10^{-4} m	15 100,4	15 47,5	12 34,7	16 689	10 5,00	10 15,85	10 30,75	10 27,6	10 3,18	10 1,95
Lin-sen-paar-ver-gleich	5+ 4- 5=	6+ 4- 4=	1+ 4- 7=	5+ 2- 8=	2+ 1- 6=	4+ 1- 4=	5+ 3- 1=	1+ 1- 7=	2+ 5- 2=	3+ 4- 2=
Ände-rung in %	+11,8%	+9,9%	-18,2%	+6,5%	-3%	+14%	+6,9%	-	-	-

TABELLE 4

Mittelwerte der Glykolysezwisehenprodukte und der Adenosinnucleotide sämtlicher Linsen ohne Berücksichtigung der Linsengewichte bei der 10^{-2} m OPB-Beeinflussung ($\frac{\mu\text{Mol}}{100\text{g}}$)

OPB	ATP	ADP	AMP	Milch-säure	G-6-ph.	Glucose	Frukto-se	BTS	Dihydroxyace-tonph.	Fruktose-1,6-diph.
0	10 83,3	10 51,5	10 47,7	17 638	17 3,26	17 16,51	17 9,69	17 28,3	17 3,42	17 1,71
10^{-2} m	17 20,4	17 34,0	17 59,2	16 584	17 0,72	17 10,83	17 3,78	17 28,1	17 3,92	17 2,47
Lin-sen-paar-ver-gleich	10- 10- 10-	1+ 6- 3=	9+ 1=	4+ 4- 8=	2+ 14- 1=	1+ 15- 1=	1+ 15- 1=	5+ 3- 9=	7+ 9- 1=	10+ 3- 4=
Ände-rung in %	-76%	-34%	+24%	-8,6%	-77,9%	-34,4%	-61,0%	-	+14,6%	+44,4%

TABELLE 5

Mittelwerte der Glykolysezwischenprodukte und der Adenosinnucleotide unter Berücksichtigung der Linsengewichte bei der 10^{-4} m OPB-Beeinflussung ($\frac{\mu\text{Mol}}{100\text{g}}$)

	ATP	ADP	AMP	Milch- säure	G-6-ph	Glucose	Frukto- se	BTS	Dihydro- xyace- tonph.	Fructose- 1,6-diph.
LG: 0-1,3g	5	5	5	5	4	4	4	4	4	4
	101,4	51,40	81,86	692	7,32	19,67	28,46	34,55	3,57	1,56
Linsen- paarver- gleich	5	5	4	5	4	4	4	4	4	4
	121,8	60,48	54,32	830,6	6,41	21,7	36,90	35,4	3,74	1,82
Änderung in %	2- 2+ 1=	4+ 1=	2- 2-	3+ 1- 1=	3=	2=	3+ 1-	2=	2=	2+
	+20,1%	+17,6%	-33,7%	+20%	-12,5%	+10,1%	+29,4%	+2,3%	+4,7%	+16,6%
LG: >1,3g	9	9	8	10	5	5	5	5	5	5
	84,64	37,24	26,1	636,2	3,23	7,48	27,73	21,46	3,66	2,80
Linsen- paarver- gleich	10	10	9	11	6	6	6	6	6	6
	94,4	41,50	20,85	622	3,37	11,05	30,20	20,23	2,78	2,13
Ände- rung in %	3+ 2- 4=	4- 2+ 3=	5=	7=	2+ 3=	3+ 2=	2+ 2- 1=	5=	4- 1+	2=
	+11,4%	+11,3%	-19,8%	-2,3%	+4,3%	+47,7%	+9%	-5,9%	-24,1%	-24%

TABELLE 6

Mittelwerte der Glykolysezwischenprodukte und der Adenosinnucleotide bei der 10^{-2} m OPB-Beeinflussung unter Berücksichtigung der Linsengewichte ($\frac{\mu\text{mol}}{100\text{g}}$)

	ATP	ADP	AMP	MS	G-6-Ph	Glucose	Fructose	BTS	Dihydroxyacetoph.	Fructose-1,6-diph.
IG:	4	4	4	7	7	7	7	7	7	7
0-1,3g	87,65	65,57	61,8	808,4	5,49	23,87	6,12	38,04	4,26	1,76
Paarvergleich	7	7	7	6	7	7	7	7	7	7
Änderung in %	20,88	38,15	85,65	663,8	1,18	14,33	1,01	37,36	5,24	2,54
	4-	4-	4+	2- 1+	7-	7-	7-	2+ 3-	5+ 2-	5+ 1-
	-76,2%	-41,8%	+38%	-17,9%	-78,6%	-40,1%	-83,6%	-1,8%	+23%	+44,3%
IG:	4	4	4	5	5	5	5	5	5	5
1,3-2g	88,15	48,7	44,7	506,6	1,99	13,60	12,73	24,08	3,60	1,75
	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5
	22,88	30,96	55,6	595,8	0,306	8,56	3,58	22,38	3,31	2,36
Paarvergleich	4-	2- 2=	4+	2+ 1- 2=	4- 1+	4- 1=	4- 1=	3= 1+ 1-	3- 1+ 1=	4+ 1-
Änderung in %	-74,1%	-36,4%	+24%	+17,6%	-84,7%	-37,1%	-71,8%	-7,1%	-8,1%	+34,8%

Fortsetzung s.S. 77

TABELLE 6
Fortsetzung von S. - 76 -

	ATP	ADP	AMP	M.S	G-6-ph.	Glucose	Frukto- se	BTS	Dihydro- xyace- tonph.	Fruktose- 1,6-diph.
IG:	2	2		5	5	5	5	5	5	5
	65,02	32,75	32,0	506,4	1,27	11,01	10,98	16,6	2,02	1,55
> 2g	5	5		5	5	5	5	5	5	5
	16,48	32,34	46,18	557,2	0,463	9,53	7,98	19,4	2,19	2,17
Paarver- gleich	2-	1+ 1=	1+ 1=	1+ 1- 3=	3- 1= 1+	4- 1+	4- 1+	2+ 3=	4- 1+	3= 1- 1+
Änderung in %	-74,7%	-1,3%	+44%	-1,6%	-63,6%	-13,4%	-27,5%	+16,9%	+8,4%	+40%

TABELLE 7

Mittelwerte der Fermente unter Berücksichtigung der Linsengewichte bei der 10^{-2} m OPB-Beeinflussung

	ALD	LDH	MDH	G-6-PDH	SDH	TIM	PK	HK	GK
LG: 0-1,3 g (Kälber)	8	8	8	8	8	8	8	8	8
	292	11907	5122	122,8	165,1	2,57	1,31	47,0	76,4
	8	8	8	8	8	8	8	8	8
282		11718	5402	93,1	152,8	2,42	1,13	47,3	72,2
Paarver- gleich	6= 2-	6= 1+ -1	3= 1- 4+	2= 6-	5= 3-	3= 1+ 4-	1= 3+ 4-	6= 1- 1+	2= 2- 4+
Änderung in %	-3,4%	-1,6%	+5,4%	-24,2%	-7,4%	-5,8%	-13,7%	-	-5,5%
LG: 1,3 g (Rinder)	6	6	6	6	6	6	6	6	6
	176	6792	4351	72,5	201,2	1,63	1,21	52,0	94,4
	6	6	6	5	6	6	6	6	6
208		6845	4245	49,6	184,8	1,98	1,14	51,1	91,4
Paarver- gleich	3+ 1- 2=	3= 1- 2+	2+ 2- 2=	3- 1+ 1=	5= 1- 1=	3= 1- 2+	3- 1+ 2=	3= 1- 2+	3- 1+ 2=
Änderung in %	+18,2%	+0,8%	-2,5%	-31,6%	-8,1%	+21,5%	-5,8%	-1,8%	-3,2%

Die Einheiten der Dehydrogenasen und der Aldolase sind in Internationale-Milli-Einheiten pro Gramm Frischgewicht umgerechnet, die Kinasen durch den zeitlichen Umsatz an Mikromol DPN (TPN) pro Gramm Gewebe ausgedrückt.

TABELLE 8

Mittelwerte der Fermente ohne Berücksichtigung des Linsengewichtes (Kälber- und Rinderlinsen)
bei der 10^{-2} m OPB-Beeinflussung

OPB	ALD	LDH	MDH	G-6-DEH	SDH	TIM	PK	HK	GK
0	14 243	14 9715	14 4792	14 98,5	14 180,6	14 2,16	14 1,27	14 49,2	14 84,1
10^{-2} m	14 250	14 8858	14 4906	14 76,3	14 166,5	14 2,23	14 1,07	14 49,9	14 84,4
Paarver- gleich	8= 3- 3+	9= 3+ 2-	5= 6+ 3-	3= 9- 1+	10= 4-	6= 5- 3+	3= 7- 4+	9= 3+ 2-	4= 5+ 5-
Änderung in %	+2,8%	-9%	+2,4%	-22,5%	-7,8%	+3,2%	-15,8%	+1,4%	-

Die Einheiten der Dehydrogenasen und der Aldolase sind in Internationale-Milli-Einheiten pro Gramm Frischgewicht umgerechnet, die Kinasen durch den zeitlichen Umsatz an Mikromol DPN (TFN) pro Gramm Gewebe ausgedrückt.

TABELLE 9

Mittelwerte der Fermente unter Berücksichtigung der Linsengewichte bei der 10^{-4} m OPB-Beeinflussung

	ALD	LDE	MDH	G-6-DPH	SDH	TIM	FK	HK	GK
LG: 0-1,3g (Kälber)	354	7475	4770	2	2	2	2	2	2
				14,3	214,1	0,43	1,26	31,4	157,6
	354	7785	4602	2	2	2	2	2	2
	2=	2=	2=	47,8	206,6	0,56	0,99	32,6	146,2
Paarver- gleich				1+, der andere Wert aus- gefallen	2=	1+ 1=	2=	2=	2=
Änderung in %	-	+4,1%	-4%	-	-3,5%	+30,2%	-21,5%	+3,8%	-7,3%
LG: >1,3g (Rinder)	231	3745	3300	2	2	2	2	2	2
				38,1	189,5	0,43	1,08	26,9	139,5
	241	3745	3200	2	2	2	2	2	2
				42,7	187,0	0,57	0,99	30,3	137,2
Paarver- gleich	2=	1+ 1=	2=	1= 1+	2=	2+	1- 1+	1= 1+	2=
Änderung in %	+4,3%	-	-3,1%	+12%	-1,6%	+32,5%	-8,4%	+12,8%	-1,7%

Die Einheiten der Dehydrogenasen und der Aldolase sind in Internationale-Milli-Einheiten pro Gramm Frischgewicht umgerechnet, die Kinasen durch den zeitlichen Umsatz an Mikromol DPN (TPN) pro Gramm Gewebe ausgedrückt.

Abb. I STOFFWECHSELSHEMA

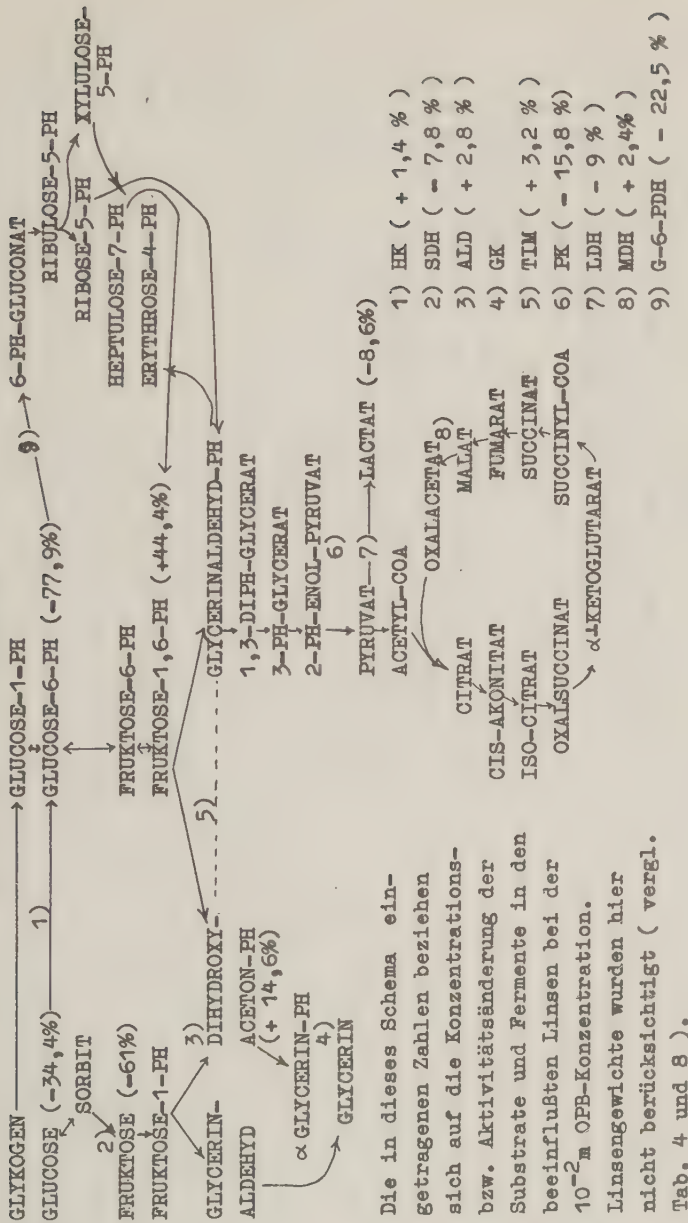
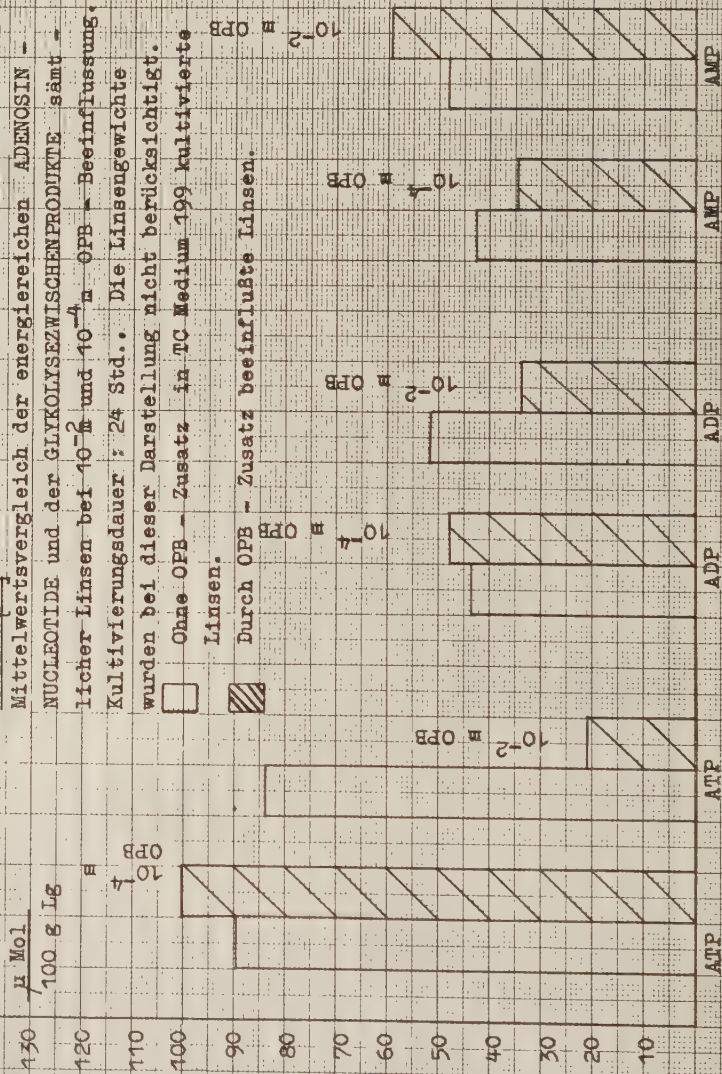


Abb. III[IV] vergl. Tab. 3 und 4)
 Mittelwertsvergleich der energiereichen ADENOSIN -
 NUCLEOTIDE und der GLYKOLYSEZWISCHENPRODUKTE sämt-
 licher Linsen bei 10^{-2} und 10^{-4} μ OPB - Beeinflussung.
 Kultivierungsdauer: 24 Std.. Die Linsengewichte
 wurden bei dieser Darstellung nicht berücksichtigt.

Ohne OPB - Zusatz in TC Medium 199 kultivierte
 Linsen.

Durch OPB - Zusatz beeinflusste Linsen.



p Mol
100 g Lg

Abb. III
(Erläuterung s. Abb. II
S. 82)

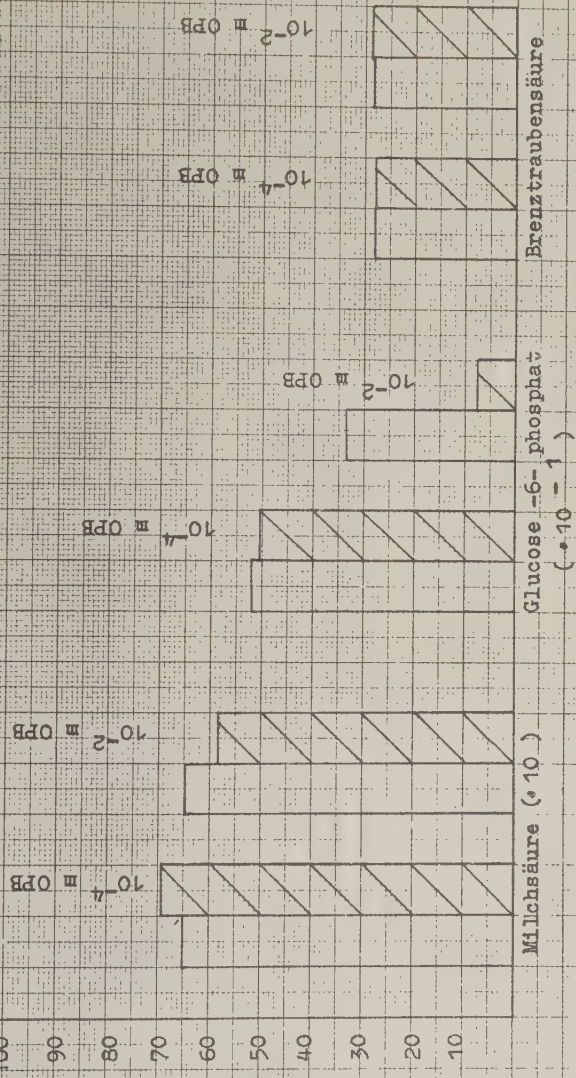


Abb. IV
(Erläuterung s. Abb.
II S. 82)

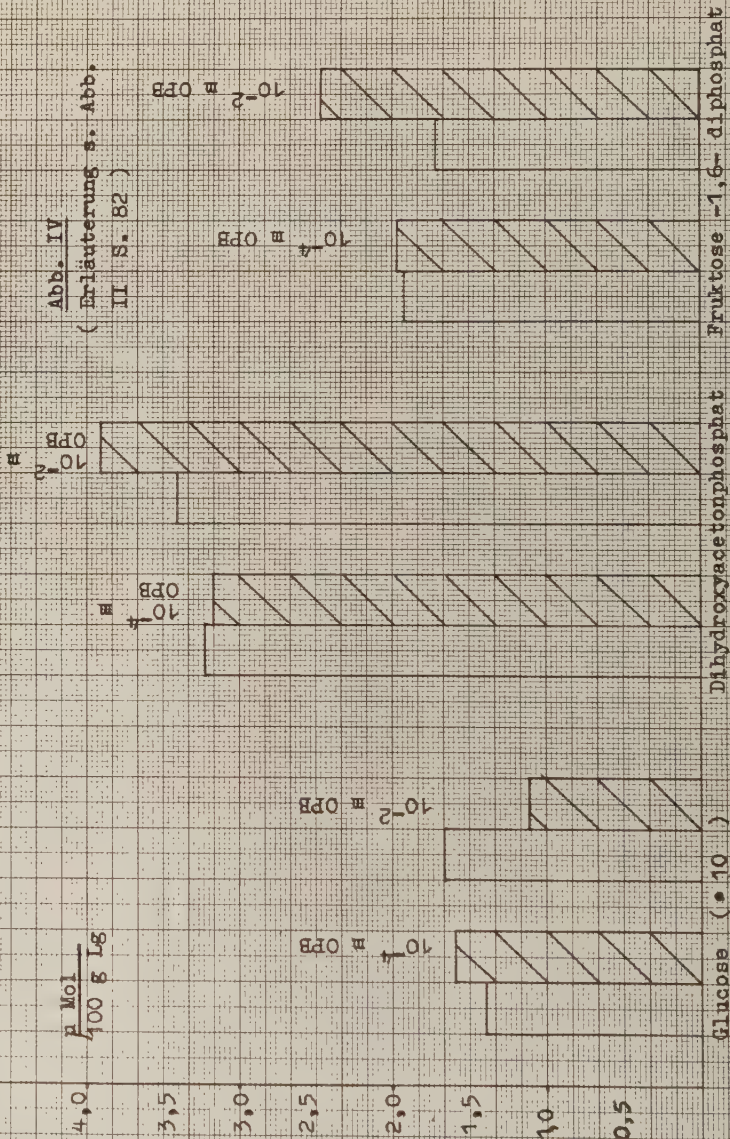


Abb. Y (vergl. Tab. 6)

Mittelwertvergleich des A T P und des A D P bei der 10^{-2} m OPB - Beeinflussung.

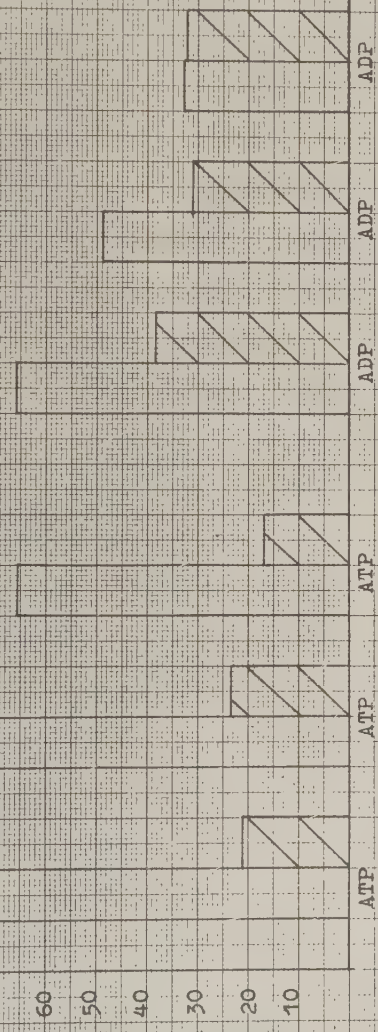
Kultivierungsdauer : 24 Std.

Die Linsengewichte wurden bei dieser Darstellung berücksichtigt.

Durch OPB-Zusatz beeinflusste Linsen.

h Mol
 100 g lg

0 - 1,3 g 1,3 - 2 g > 2 g 0 - 1,3 g 1,3 - 2 g > 2 g



μ Mol
100 g Ig

Abb. VI (vergl. Tab. 6)

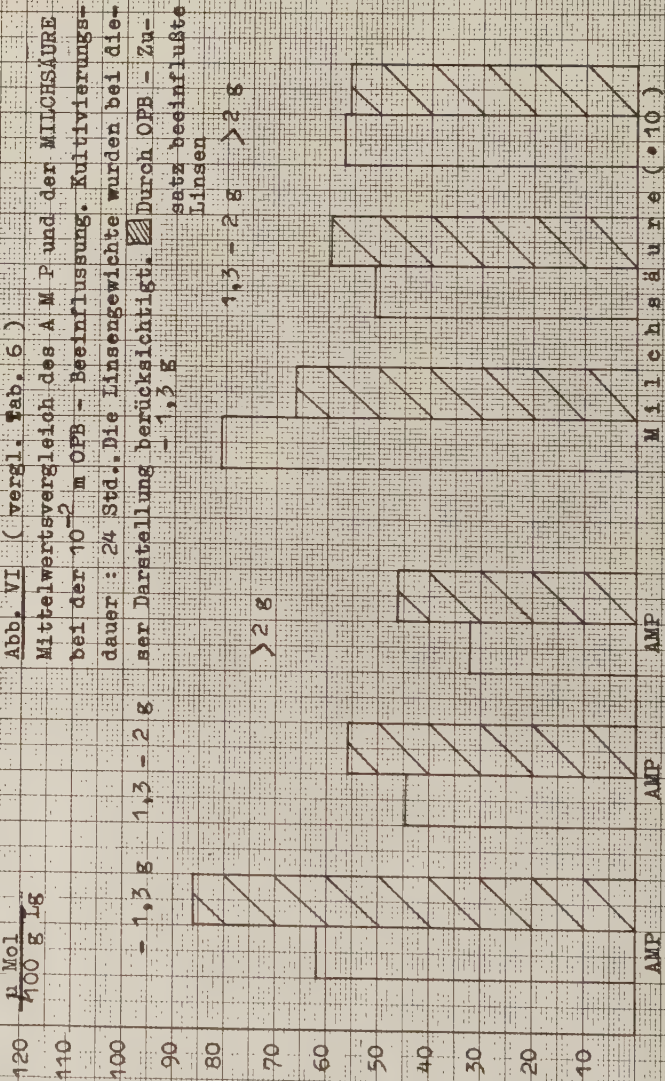
Mittelwertsvergleich des A M P und der MILCHSÄURE
bei der 10⁻² m OPB - Beeinflussung. Kultivierungs-
dauer : 24 Std.. Die Linsengewichte wurden bei die-
ser Darstellung berücksichtigt.  Durch OPB - Zu-
satz beeinflusste
Linsen

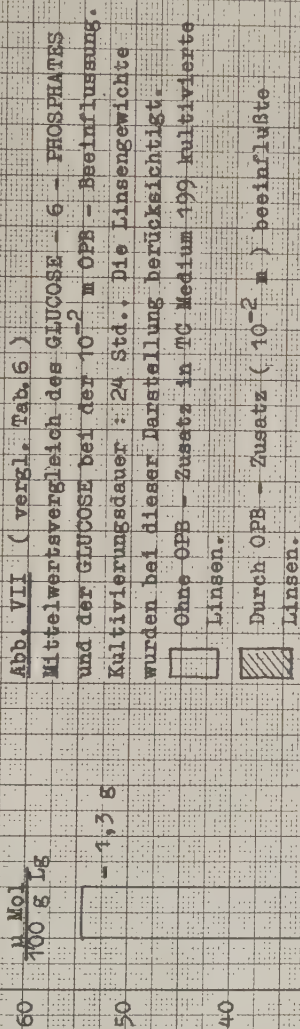
- 1,3 g 1,3 - 2 g

1,3 - 2 g > 2 g

> 2 g

86





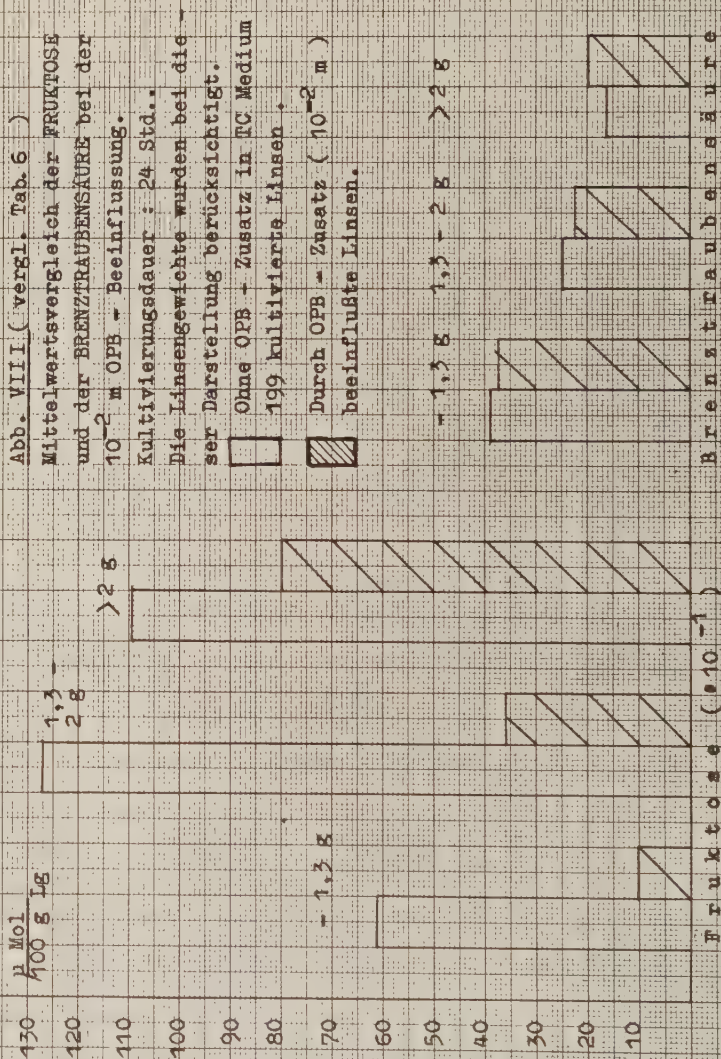
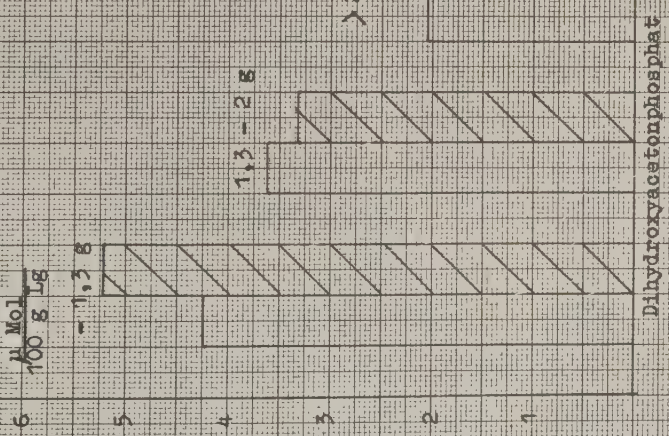


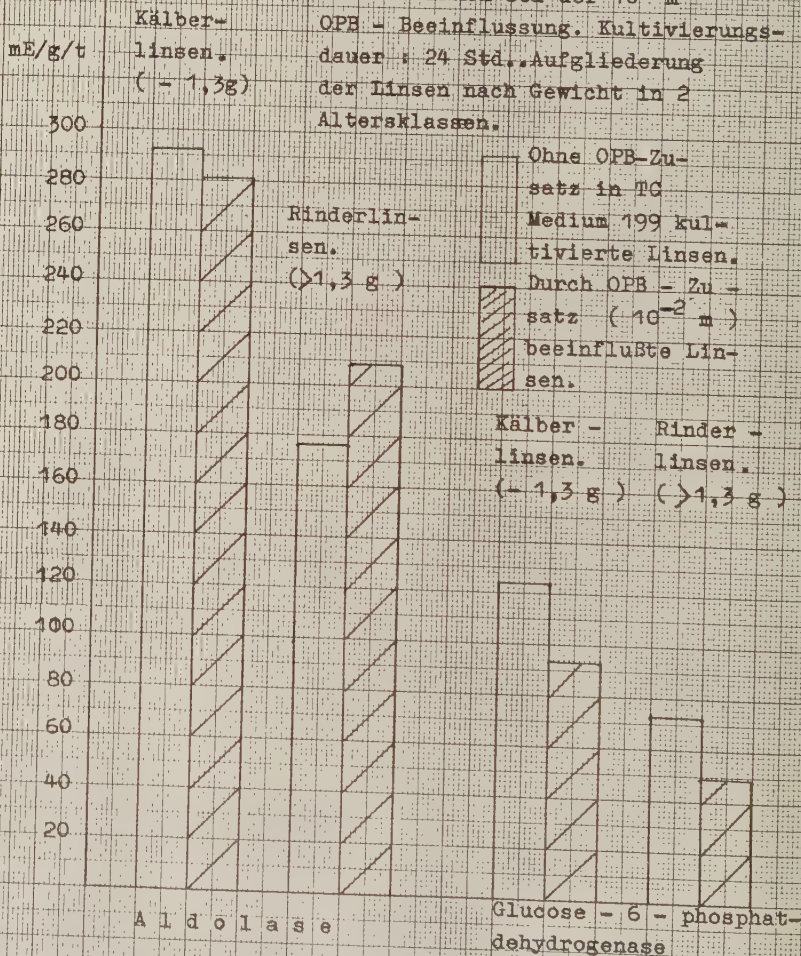
Abb. II (vergl. Tab. 6)
 Mittelwertsvergleich des DIHYDROXYACETON -
 PHOSPHATES und des FRUKTOSE - 1,6 - DI -
 PHOSPHATES bei der 10^{-2} m OPB - Beeinflussung.
 Kultivierungsdauer : 24 Stä.. Die Linsen-
 gewichte wurden bei dieser Darstellung
 berücksichtigt.



Durch OPB - Zusatz (10^{-2} m) beein-
 flusste Linsen.

Abb. X (vergl. Tab. 7)

Mittelwertsvergleich der Fermentaktivitäten der ALDOLASE und der GLUCOSE - 6 - PHOSPHAT-DEHYDROGENASE bei der $10^{-2}m$ OPB - Beeinflussung. Kultivierungsdauer : 24 Std., Aufgliederung der Linsen nach Gewicht in 2 Altersklassen.



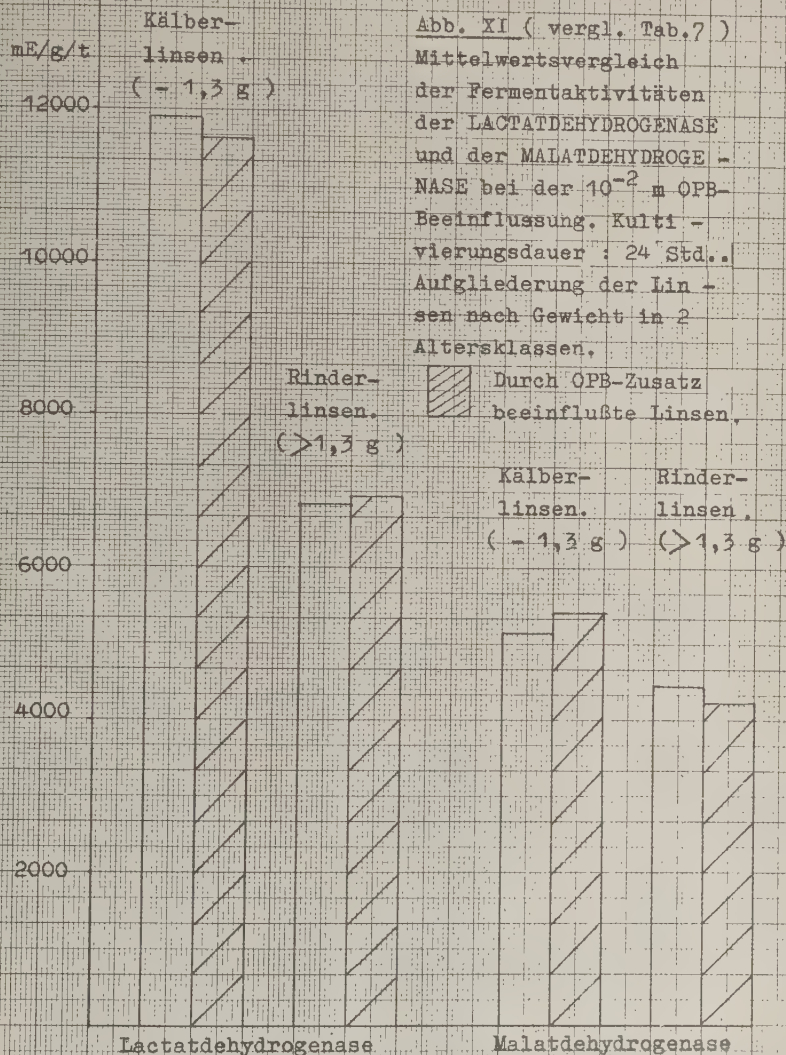
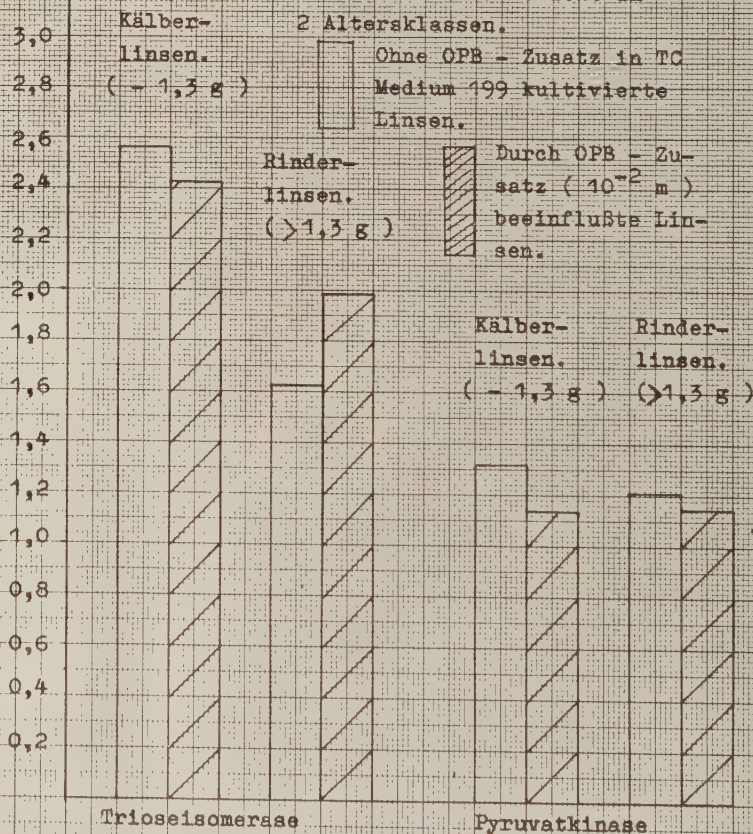
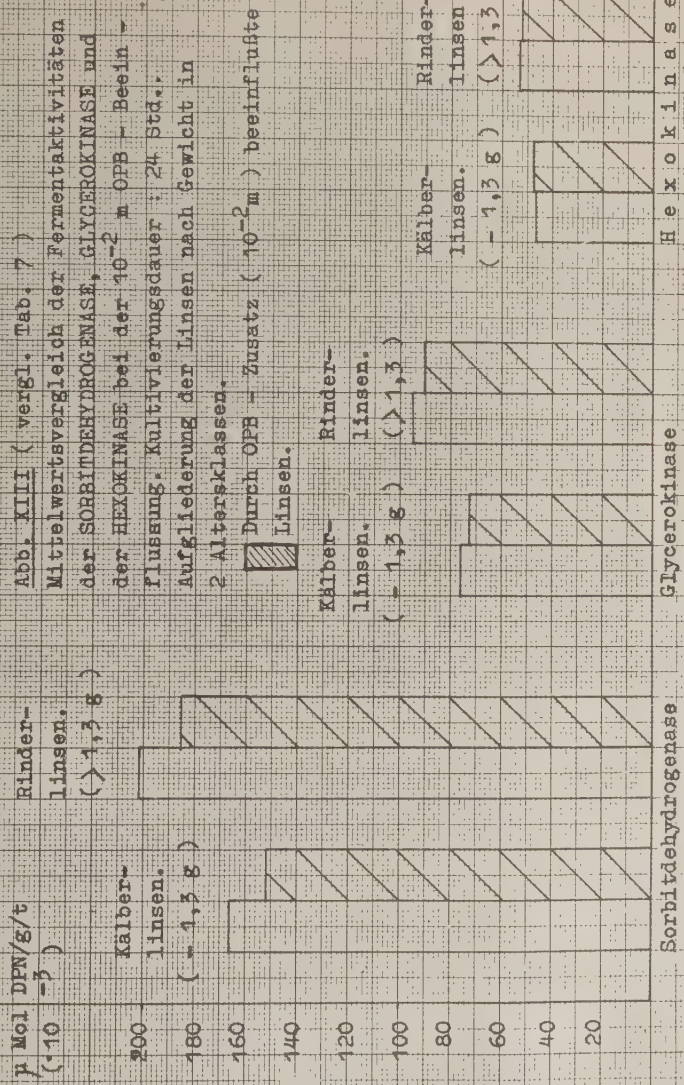


Abb. XII (vergl. Tab. 7)

Mittelwertsvergleich der Fermentaktivitäten der TRIOSE-ISOMERASE und der PYRUVAT-KINASE bei der 10^{-2} m OPB - Beeinflussung. Kultivierungsdauer : 24 Std., Aufgliederung der Linsen nach Gewicht in 2 Altersklassen.

μ Mol DPN/g/t
($\cdot 10^{-3}$)





L e b e n s l a u f

Am 3. April 1943 wurde ich als Sohn des Bauingenieurs Heinrich Kuhlmann und dessen Ehefrau Elfriede, geb. Heine in Lemgo geboren.

Von 1949 bis 1954 besuchte ich die Volksschule in Bösingfeld, danach bis zur mittleren Reife das Gymnasium in Barntrop und dann 3 Jahre die Oberstufe des Engelbert - Kämpfer - Gymnasiums in Lemgo, wo ich am 19. 2. 1963 die Reifeprüfung ablegte.

Zum Sommersemester 1963 wurde ich als Student der Medizin an der Rheinischen Friedrich - Wilhelms - Universität in Bonn immatrikuliert. Im Herbst 1965 bestand ich dort die ärztliche Vorprüfung. Zum Sommersemester 1966 wechselte ich an die Universität Wien, kehrte jedoch zum Wintersemester 1966/67 wieder nach Bonn zurück und legte hier am 19. 2. 1969 mein Staatsexamen ab.

